

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HASTANE KÖKENLİ PNÖMONİ ETKENİ
KLEBSIELLA VE *ACINETOBACTER*
KÖKENLERİNDE BİYOFİLM YAPIMI VE
ANTİBAKTERİYEL DUYARLILIĞIN
ARAŞTIRILMASI

DR. İLKAY NUR CAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2021

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HASTANE KÖKENLİ PNÖMONİ ETKENİ
KLEBSIELLA VE *ACINETOBACTER*
KÖKENLERİNDE BİYOFİLM YAPIMI VE
ANTİBAKTERİYEL DUYARLILIĞIN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. İLKAY NUR CAN

Danışman Öğretim Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Sema Alp Çavuş

Proje No: 2020.KB.SAG.010

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü Tarafından

99.3456.23 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	V
TABLO LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
RESİM LİSTESİ.....	X
TEŞEKKÜR.....	XI
ÖZET.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sağlık Bakımı İlişkili Enfeksiyonlar.....	3
2.1.1. Tanımlar ve sınıflama.....	3
2.1.1.1. Sağlık bakımı ilişkili pnömoni.....	4
2.1.1.1.1. Ventilatör ilişkili pnömoni.....	5
2.1.1.1.2. Ventilatör ilişkili pnömoni ve biyofilm yapısı.....	6
2.1.2. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonların klinik önemi.....	7
2.1.3. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon gelişimine etki eden risk faktörleri.....	8
2.1.4. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon kliniği oluşturan mikroorganizmalar.....	8
2.1.4.1. <i>Klebsiella</i>	9
2.1.4.2. <i>Acinetobacter</i> spp.....	10
2.2. Biyofilm Tabakası.....	11
2.2.1. Biyofilm tanımı.....	11
2.2.2. Biyofilm yapısı.....	11
2.2.2.1. Biyofilm yapısı içerisinde bulunan mikroorganizmalar.....	11
2.2.2.2. Matriks yapısı.....	12

2.2.2.3.	Biyofilm Yapısının Moleküler Temeli.....	13
2.2.3.	Biyofilm oluşumu.....	14
2.2.3.1.	Yüzey şartlandırma.....	14
2.2.3.2.	Geçici bağlanma (adezyon)	14
2.2.3.3.	Geri dönüşsüz bağlanma (agregasyon)	14
2.2.3.4.	Olgunlaşma (maturasyon)	15
2.2.3.5.	Ayrılma (detachment) ..	15
2.2.4.	Biyofilm yapısı ve enfeksiyonlar.....	16
2.2.4.1.	Biyofilm yapısı ilişkili enfeksiyon patogenezi.....	16
2.2.4.2.	Biyofilm yapısı ilişkili hastalıkların sınıflaması.....	17
2.2.4.2.1.	Yabancı cisim ilişkili biyofilm enfeksiyonları.....	18
2.2.4.2.2.	Yabancı cisim ilişkili olmayan biyofilm enfeksiyonları.....	18
2.2.4.2.3.	Biyofilm ilişkili medikal ekipmanın fonksiyon kaybı.....	19
2.2.5.	Biyofilm yapısı ve antibiyotik direnci.....	19
2.2.5.1.	Antimikrobiyal ajanın biyofilm matriksine penetrasyonunun gecikmesi	
2.2.5.2.	Biyofilm oluşturan organizmaların değişken büyüme paterni.....	20
2.2.5.3.	Diğer fizyolojik değişiklikler	21
2.2.6.	Biyofilm oluşumunun klinik önemi.....	21
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1.	Çalışma Yeri ve Zamanı.....	23
3.2.	Etik Kurul Onayı.....	23
3.3.	Hasta Alımı	23
3.3.1.	Çalışmaya dahil edilme kriterleri.....	23
3.3.2.	Çalışmadan dışlama kriterleri.....	24
3.3.3.	Kaydedilen veriler.....	24
3.3.4.	İzolatların toplanması ve saklanması	24
3.4.	Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri.....	25
3.4.1.	İzolatların canlandırılması.....	25
3.4.2.	Bakteri tanımlama yöntemleri.....	25
3.5.	Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	26
3.5.1.	E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	26
3.5.2.	Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	26

3.5.2.1.	Antibiyotiklerin hazırlanması ve saklanması.....	27
3.5.2.2.	Müller Hinton Broth sıvı besiyerinin hazırlanması.....	28
3.5.2.3.	inokulumun hazırlanması.....	28
3.5.2.4.	Bakteri inokülasyonu öncesi hazırlık.....	28
3.5.2.5.	Bakteri inokülasyonu.....	2
3.5.2.6.	MIK değerlerinin belirlenmesi.....	29
3.6.	Biyofilm Kapasitesinin Değerlendirilmesi.....	30
3.6.1.	String testi (ST).....	30
3.6.2.	Kongo kırmızısı agar yöntemi (KKAY).....	31
3.6.3.	Tüp metodu (TM).....	31
3.6.4.	Doku kültür plak metodu	32
3.6.4.1.	96'lı mikrolaka kuyucuklarında biyofilm oluşumunun indüksiyonu...32	
3.6.4.2.	Oluşturulan biyofilm yapısının boyanması.....	33
3.6.4.3.	Oluşturulan biyofilm yapısının spektrofotometre ile ölçümü.....	34
3.7.	İstatistiksel analiz.....	35
4.	BULGULAR	36
4.1.	Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler.....	36
4.2.	Çalışmaya Dahil Edilen Hastalar.....	36
4.2.1.	Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet ve KPES bilgileri.....	36
4.2.2.	Çalışmaya dahil edilen hastaların HAI, VIP ve MDR organizma ile enfeksiyon gelişimine etki eden risk faktörleri.....	37
4.2.3.	Çalışmaya dahil edilen hastaların yoğun bakım ünitelerine dağılımı.....	38
4.2.4.	Hastaların VIP epizodu ve 30 günlük izlem sonuçları	39
4.3.	Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	42
4.3.1.	E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	42
4.3.2.	Mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	43
4.4.	E-Test ve Mikrodilüsyon Test Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	44
4.4.1.	<i>Klebsiella</i> spp grubunda antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması	
4.4.2.	<i>Acinetobacter</i> spp grubunda antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.....	45
4.4.3.	Tüm örneklerin antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.....	46

4.4.4.E-test yöntemi antibiyotik duyarlılık sonuçlarının mikrodilüyon yöntemi karşılaştırılarak değerlendirilmesi.....	47
4.5. Biyofilm Üretiminin Farklı Yöntemlerle Test Edilmesi.....	47
4.5.1. Doku kültür plak metodu ile biyofilm üretiminin test edilmesi.....	53
4.5.2. Tüp metodu ile biyofilm üretiminin test edilmesi.....	53
4.5.3. Kongo kırmızısı a gar yöntemi ile biyofilm üretiminin test edilmesi.....	54
4.5.4. String yöntemi ile biyofilm üretiminin test edilmesi.....	54
4.6. Biyofilm Üretiminin Derecelendirilmesi.....	55
4.7. Biyofilm Üretimi Analiz Testlerinin Değerlendirilmesi.....	56
4.7.1. Tüp metodunun değerlendirilmesi.....	57
4.7.2. Kongo kırmızısı agar yönteminin değerlendirilmesi.....	58
4.7.3. String testinin değerlendirilmesi.....	60
4.7.4. Biyofilm üretim derecelerinin karşılaştırılması... ..	62
4.8. Biyofilm Üretimi ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.....	64
4.8.1. Tüm hasta grubunun değerlendirilmesi.....	64
4.8.2. <i>Acinetobacter</i> spp grubunun değerlendirilmesi.....	64
4.8.3. <i>Klebsiella</i> spp grubunun değerlendirilmesi.....	65
4.8.4. Biyofilm üretim derecesi ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin incelenmesi.....	66
4.9. Biyofilm Üretimi ile Hasta Sonlanımı Arasındaki İlişkilinin İncelenmesi.....	67
4.10. Biyofilm üretim derecesi ile hasta sonlanımları arasındaki ilişkinin incelenmesi.....	67
4.11. Biyofilm Üretimi ile İlişkili Verilerin Değerlendirilmesi.....	68
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
7. KAYNAKLAR.....	76
8. EKLER.....	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

- **HİP**: Hastane İlişkili Pnömoni
- **VİP**: Ventilatör İlişkili Pnömoni
- **EPS**: Ekstraselüler Polimerik Substans
- **ÇİD**: Çok İlaça Dirençli
- **CDC**: Centers for Disease Control and Prevention
- **HAI**: Healthcare Associated Infections, Hospital Associated Infections
- **ABD**: Amerika Birleşik Devletleri
- **KİKDE**: Kateter İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonu
- **KİÜSE**: Kateter İlişkili Üriner Sistem Enfeksiyonu
- **CAE**: Cerrahi Alan Enfeksiyonu
- **MV**: Mekanik ventilatör
- **KPES**: Klinik Pulmoner Enfeksiyon Skoru
- **SVO**: Serebro Vasküler Olay
- **MI**: Myokard Infarktüs
- **ET**: Endotrakeal Tüp
- **GSBL**: Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz
- **QS**: Quorum Sensing
- **DNA**: Deoksiribo Nükleik Asit
- **SPSS**: Statistical Package for the Social Sciences
- **DEÜTF**: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
- **MİK**: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
- **EUCAST**: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- **KAMHB**: Katyon Ayarlı Müller Hinton Broth
- **KKAY**: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi
- **TM**: Tüp Metodu
- **DKPM**: Doku Kültür Plak Metodu
- **MRSA**: Metisilin Dirençli *S.aureus*
- **PBS**: Fosfat Tamponlu Salin
- **ODc**: Optik Dansite cut off
- **ARDS**: Acute Respiratory Distress Syndrome

- **AYB:** Anestezi Yoğun Bakım
- **DYB:** Dahiliye Yoğun Bakım
- **GYB:** Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım
- **NYB:** Nöroloji Yoğun Bakım



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	27
Tablo 2. OD Değerinin ODc ile Karşılaştırılarak Biyofilm Üretim Derecesinin Belirlenmesi ⁶⁹	35
Tablo 3. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Yaş, Cinsiyet ve KPES Bilgileri.....	37
Tablo 4. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların HAI, VİP ve ÇİD Mikroorganizma ile Enfeksiyon Gelişimine Etki Eden Risk Faktörleri	38
Tablo 5. E-test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	42
Tablo 6. Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	43
Tablo 7. <i>Klebsiella</i> spp Grubunda Seftazidim Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	44
Tablo 8. <i>Klebsiella</i> spp Grubunda Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması. ...	44
Tablo 9. <i>Klebsiella</i> spp Grubunda Amikasin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	44
Tablo 10. <i>Acinetobacter</i> spp Grubunda Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması	
Tablo 11. <i>Acinetobacter</i> spp Grubunda Amikasin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması...45	
Tablo 12. Tüm örneklerde Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	46
Tablo 13. Tüm örneklerde Amikasin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	46
Tablo 14. E-Test Yöntemi Antibiyotik Duyarlılık Sonuçlarının Mikrodilüsyon Yöntemi Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi.	47
Tablo 15. Tüm Örneklerin Farklı Yöntemlerle Biyofilm Üretimi Test Sonuçları.....	48
Tablo 16. Tüp Metodu Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Tüm Örnekler)	57
Tablo 17. Tüp Metodu Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Gruplar Arasında)	58
Tablo 18. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Tüm Örnekler)	59

Tablo 19. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Gruplar Arasında)	59
Tablo 20. String Testi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Tüm Örnekler)	60
Tablo 21. String Testi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Gruplar Arasında)	61
Tablo 22. Biyofilm Analiz Testlerinin Tanısal Değerleri	62
Tablo 23. Tüm Örneklerin Biyofilm Üretim Derecelerinin Karşılaştırılması.	63
Tablo 24. <i>Acinetobacter</i> spp. Grubunda Biyofilm Üretim Derecelerinin Karşılaştırılması.....	63
Tablo 25. <i>Klebsiella</i> spp. Grubunda Biyofilm Üretim Derecelerinin Karşılaştırılması.....	63
Tablo 26. Tüm Hasta Grubunda Kolistin, Meropenem, Amikasin Direnci ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki	64
Tablo 27. <i>Acinetobacter</i> spp Grubunda Kolistin, Meropenem, Amikasin Direnci ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki	64
Tablo 28. <i>Klebsiella</i> spp Grubunun Kolistin, Meropenem, Amikasin Duyarlılığı ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki	65
Tablo 29. <i>Klebsiella</i> spp Grubunda Seftazidim, Tigesiklin, Fosfomisin Direnci ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki	65
Tablo 30. Biyofilm Üretim Derecesi ile Kolistin, Meropenem ve Amikasin Direnci Arasındaki İlişki.....	66
Tablo 31. Biyofilm Üretim Derecesi ile Seftazidim, Tigesiklin ve Fosfomisin Direnci Arasındaki İlişki	66
Tablo 32. Biyofilm Üretim Derecesi ile VİP Sonlanımı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	67
Tablo 33. Biyofilm Üretim Derecesi ile 30 Günlük Hasta İzlenimi Sonlanımı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	68
Tablo 34. Biyofilm Üretimi ile İlişkili Verilerin Değerlendirilmesi	68

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. QS Sinyalleri ile Biyofilm Oluşumunun İndüksiyonu ³⁷	.13
Şekil 2. Biyofilm Yapısının Oluşum Aşamaları ⁴⁷	15
Şekil 3. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Yoğun Bakım Ünitelerine Dağılımı	39
Şekil 4. VİPEpizodu Sonlanımı.	40
Şekil 5. 30 günlük Hasta İzlemi Sonlanımı.	41
Şekil 6. Biyofilm Üretiminin Doku Kültür Plak Metodu ve Tüp Metodu ile Derecelendirilmesi	56



RESİM LİSTESİ

Resim 1. Endotrakeal Tüp İç Yüzeyinde Biyofilm Yapısı ³⁷	6
Resim 2. Biyofilm Yapısının Elektron Mikroskop Görüntüsü ¹²	12
Resim 3. Boncuklu stok besiyeri	25
Resim 4. String Testi ⁶⁴	30
Resim 5. Biyofilm Üretiminin Tüp Yöntemi ile Değerlendirilmesi	32
Resim 6. 96'lı Mikroplakalarda Oluşumu İndüklenen Biyofilm Yapısının Boyanması.	33
Resim 7. 96'lı Mikroplakalarda Oluşturulan Biyofilm Yapısının Spektrofotometre ile Ölçümü	34
Resim 8. E-Test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi	42
Resim 9. Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi	43

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi süresince ve öncesinde en zor koşullar altında bile yılmadan, bıkmadan, benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, uzmanlık eğitimimi tamamlamamda en büyük destekçim olan annem Hatice Can ve babam Servet Can'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Asistanlığım süresince karşılaştığım zorluklara karşı mücadele etmem için beni motive eden, süreci tamamlamam için beni yüreklendiren başta Dr. Selcen Özer, Dr. Nejla Göcen ve Selçuk Göcen olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tanıştığımız ilk günden beri dostluğu ile zor zamanlarımda yanımda olan, uzmanlık eğitimim süresince manevi desteğini her zaman hissettiğim ve tez sürecimde istatistik kısmında destek olan Çağatay Ermiş'e

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecimde bilgisi ve deneyimiyle yol gösteren tez danışman hocalarım Prof. Dr. Nur Yapar'a ve Dr. Öğr. Gör. Sema Alp Çavuş'a,

Değerli anabilim dalı hocalarım Prof. Dr. Vildan Avkan Oğuz, Doç. Dr. Ziya Kuruüzüm, Öğr. Gör. Uzm. Dr. Oya Özlem Eren Kutsoylu, Öğr. Gör. Uzm. Dr. Arzu Nazlı ve Öğr. Gör. Uzm. Dr. Muammer Çelik'e,

Çalışma süresince bilgisini ve desteğini paylaşan, her ihtiyaç duyduğumda yardımını esirgemeyen değerli Doç. Dr. Mahmut Cem Argon' a,

Bir abla sıcaklığı ve samimiyeti ile tez sürecimin laboratuvar çalışmaları aşamasında her ihtiyaç duyduğumda deneyimlerini aktararak yol gösteren başta Meral Biçmen olmak üzere DEÜTF Bakteriyoloji Laboratuvarı ekibine,

Çalışmanın aksamadan tamamlanmasında özveri ile emek veren sterilizasyon ünitesinin değerli çalışanları Şeniz Dalkılıç, Muhammed Boyacıoğlu ve Arzu Dal'a,

Başta Meryem Işık olmak üzere özlediğim ve özleyeceğim tüm enfeksiyon hastalıkları servis ekibine,

Tez süresince her türlü manevi desteğini ve grafik tasarımlarında emeğini esirgemeyen kıymetli arkadaşım Sinan Murat Keşen'e

İçten teşekkür, sevgi ve saygılarımla ...

Dr. İlkay Nur Can

ÖZET

Hastane Kökenli Pnömoni Etkeni *Klebsiella* ve *Acinetobacter* Kökenlerinde Biyofilm Yapımı ve Antibakteriyel Duyarlılığın Araştırılması

Dr. İlkay Nur Can

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Sema Alp Çavuş

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı, İzmir

Amaç: Mikroorganizmaların birbirlerine ve yüzeye tutunarak oluşturdukları biyofilm yapısı bilinen enfeksiyon kliniklerinin önemli kısmından sorumludur. Tedaviye direnç ve nüks gelişimine sebep olarak hasta sonlanımını olumsuz etkilemektedir. Bu çalışmada Ventilator İlişkili Pnömoni (VİP) patojeni *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp suşlarının biyofilm yapabilme kapasitelerinin ve antibiyotik duyarlılığının farklı yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmaya Ekim 2019-Haziran 2021 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakterioloji Laboratuvarı' na gönderilen trakeal sekresyon örneklerinde *Acinetobacter* spp veya *Klebsiella* spp izole edilen, Klinik Pulmoner Enfeksiyon Skoru (KPES) 6 üzerinde olan ve entübasyon ile örnek alımı arasında en az 48 saat süre olan hastalar dahil edildi. Hastaların trakeal sekresyon örneklerinden izole edilen suşların antibiyotik duyarlılığı E-test ve mikrodilüsyon yöntemiyle , biyofilm yapabilme kapasitesi String testi, Kongo Kırmızısı Agar (KKA) Yöntemi ve Tüp Metodu (TM) ve Doku Kültür Plak Metodu (DKPM) ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlar ile yöntemlerin birbiri ile karşılaştırılması ve hastaların klinik bilgileri ile korelasyonu analiz edildi .

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen suşlarda biyofilm oluşumu ile kolistin , meropenem ve amikasin direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p=1 ,000, p=1,000, p=0,597). Biyofilm üretimi ile VİP epizodunun sonlanımı ve 30 günlük hasta

izleminin sonlanımı açısından anlamlı ilişki saptanmadı ($p=1,000$, $p=0,852$). String testinin duyarlılığı %5,75, özgüllüğü %90,91 ($p=0,001$), Kongo Kırmızısı Agar Yönteminin duyarlılığı %22,99, özgüllüğü ise %90,91 ($p=0,001$) ve Tüp Metodunun duyarlılığı %83,91, özgüllüğü ise %0 ($p=0,690$) bulundu.

Sonuç: Çalışmamızda VİP gelişimine sebep olan mikroorganizmalarda yüksek direnç ve biyofilm oranı saptanmıştır. Biyofilm oluşumu ile hasta sonlanımı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, antibiyotik direnci, VİP, mortalite



ABSTRACT

Investigation of Biofilm Production and Antibacterial Susceptibility in Hospital-Acquired Pneumonia Caused by *Klebsiella* and *Acinetobacter* species

Dr. İlkey Nur Can

Thesis Advisor: Assistant Professor Sema Alp Çavuş

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 35340, Inciraltı, İzmir

Aim: Biofilm structure is formed by the adhesion of microorganisms to each other and to the surface. Biofilm formation has a key role for the formation of infectious diseases . It negatively affects the outcome of illnesses via causing relapse and antibiotic resistance. This study aimed to investigate biofilm-forming characteristics and antibacterial susceptibility of two Ventilator Associated Pneumonia (VAP) pathogens including *Acinetobacter* spp and *Klebsiella* spp strains.

Method: *Acinetobacter* spp or *Klebsiella* spp was isolated in the tracheal secretion samples between October 2019 and June 2021. Patients with Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS)> 6 and time of intubation > 48 hours were included. The antibacterial susceptibility of the isolated strains was investigated using E-test and microdilution method. The biofilm-forming capacity of the isolated strains was investigated by String test, Congo Red Agar (CRA) Method, Tube Method (TM) and Tissue Culture Plate Method (TCPM).

Results: in the 98 samples included this study, there was no significant relationship between biofilm formation and colistin, meropenem and amikacin susceptibility. Likewise the association between biofilm production and the outcome of VAP was not statistically significant. The sensitivity of the String test is 5.75%, the specificity is 90.91% (p=0.001). The sensitivity of the Congo Red Agar Method is 22.99%, the specificity is 90.91% (p=0.001), and

the sensitivity of the Tube Method is 83.91% and specificity of the Tube Method is 0% (p=0.690).

Discussion: Microorganisms had high rates of biofilm production and antibiotic resistance in our study. No relationship was found between biofilm formation and clinical outcomes.

Keywords: Biofilm, antibiotic resistance, VIP, mortality



1. GİRİŞ VE AMAC

Dünya genelinde sağlık bakım hizmeti alan hastalar arasında en sık izlenen komplikasyon sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlardır.¹⁻³ Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon gelişimine çevresel, hasta ilişkili ve sağlık bakımı ilişkili birçok faktör etki etmektedir.⁴ Hastaların tanı ve tedavisinde uygulanan invaziv işlemler ve kullanılan medikal ekipmanlar (santral kateter, mekanik ventilatör, prostetik maddeler vb) sağlık bakımı ilişkili faktörler olup enfeksiyon gelişimi ile ilişkilendirilmektedir.^{4,5} Altta yatan hastalıkların diğer hastalara kıyasla daha şiddetli olması ve invaziv ekipman kullanımının , girişimsel işlemlerin daha sık uygulanması nedeniyle yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastalarda sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon gelişim riski diğer hastalardan daha yüksektir.^{5,6}

Tüm sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon tiplerinde mortalite ve morbiditede artış, hastanede yatış süresinde uzama görülmektedir.^{5,6} Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlar arasında nozokomiyal pnömoni, üriner kateterizasyon ilişkili üriner sistem enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları ve santral kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları bulunmaktadır.¹ Nozokomial pnömoniler sağlık bakım hizmeti alan hastalar arasında sık gelişmesi ve mortalite oranının yüksek olması nedeniyle önemlidir.⁵⁻⁷

Nozokomial pnömoniler güncel rehberlerde ' Hastane İlişkili Pnömoni (HİP)' ve ' Ventilatör İlişkili Pnömoni (VİP)' olarak sınıflandırılmaktadır.^{2,3} HİP mekanik ventilatör desteği almayan hastalarda hastane yatışının 48 saat ve sonrasında pnömoni kliniğinin gelişmesi olarak tanımlanırken VİP mekanik ventilatör desteğinde izlenen hastalarda endotrakeal entübasyondan 48 saat ve sonrasında pnömoni kliniğinin gelişmesi olarak tanımlanmıştır.^{2,3} Başlıca VİP komplikasyonları sebep olan organizmaya, hastanın altta yatan hastalıklarına bağlı olarak değişmektedir. Ampiyem , parapnömonik effüzyon, sepsis VİP kliniği sırasında sık görülen komplikasyonlardır.⁵

Mekanik ventilasyon VİP riskini en çok arttıran faktör olarak tanımlanmıştır.⁸ Mekanik ventilasyon süresi uzadıkça VİP gelişme riski arttığı bilinmekle birlikte güncel çalışmalar VİP gelişiminde biyofilm varlığının entübasyon süresinden daha önemli olduğunu düşündürmektedir.⁸⁻¹¹ Mikroorganizmalar birbiri ile iletişim kurarak ekstraselüler polimerik substans (EPS) sentezini kontrol eder. Bu EPS yapısı içerisinde mikroorganizmaların

birbirlerine ve canlı/cansız yüzeylere geri dönüşümsüz bağlanması ile biyofilm yapısı oluşur.^{12,13}

Bilinen mikroorganizmaların pek çoğu biyofilm oluşumuna sebep olmaktadır.¹⁴ Biyofilm oluşumuna katılan mikroorganizmalar antimikrobiyallerden ve konak immun yanıtından korunur. Bu durum enfeksiyonun kronikleşmesine ve doku hasarına neden olmaktadır.^{14,16} Kronik bakteriyel enfeksiyonların %80'den fazlası biyofilm yapısı ile ilişkilendirilmiştir.¹⁴ VİP sıklıkla polimikrobiyaldir ve antibiyotik direncinin sık görüldüğü ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter*spp.) patojenler VİP gelişiminde önemli rol oynar.¹⁷

VİP gelişen hastalarda antibiyotik direnci nedeniyle antibiyoterapi seçenekleri kısıtlıdır.^{18,19} Karbapenemler, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler, fosfomisin, aminoglikozitler, tigesiklin, kolistin çok ilaca dirençli (ÇİD) *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp suşlarının tedavisinde kullanılabilen sınırlı antimikrobiyallerdir.^{18,20}

Çalışmamızda hastanemizde yoğun bakımda izlemi sırasında VİP gelişen hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp suşlarının biyofilm yapabilme kapasitelerinin ve seftazidim, meropenem, fosfomisin, amikasin, tigesiklin ve kolistine duyarlılıklarının farklı yöntemlerle test edilmesi, biyofilm üretimi ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin incelenmesi ve elde edilen verilerin hasta sonlanımına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp VİP sırasında sıklıkla izole edilen patojenler olması nedeniyle seçilmiştir.

2. **GENEL BİLGİLER**

2.1. **Sağlık Bakımı İlişkili Enfeksiyonlar**

2.1.1. **Tanımlar ve sınıflama**

Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından bir veya daha fazla enfeksiyöz ajanın ya da toksinin sebep olduğu lokalize veya sistemik durum "enfeksiyon" olarak tanımlanmaktadır.²¹ Bir enfeksiyon kliniğinin sağlık bakımı ile ilişkilendirilebilmesi için hastanın başvuru sırasında enfeksiyona dair klinik bulgularının mevcut olmaması ve inkübasyon döneminde bulunmaması gerekmektedir.^{5,21} Enfeksiyon etkeni sağlık merkezinde edinildiğinden klinik bulgular hasta yatışından en az 48 saat geçtikten sonra bazı durumlarda ise hasta taburcu edildikten sonra gelişir.^{5,22} Nozokomial enfeksiyonlar önceleri "Hastane Enfeksiyonları" (Hospital Associated Infections, HAI) olarak adlandırılrsa da güncel kaynaklarda hastane, uzun süreli bakım merkezleri ve ayakta tedavi merkezlerinde tedavi gören tüm hastalar göz önünde bulundurularak "Sağlık Bakımı ilişkili Enfeksiyonlar" (Healthcare Associated Infections, HAI) şeklinde yeniden adlandırılmıştır.^{1,5}

Sağlık bakımı almakta olan hastalar arasında HAI oldukça sık gözlenmektedir.^{5,23} Dünya genelinde gerçek yük güvenilir veri ve sürveyans sistemlerinin eksikliği nedeniyle bilinmemekle birlikte epidemiyolojik çalışmanın en çok yapıldığı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nden (ABD) bildirilen çalışmalar birbirleri ile tutarlı sonuçlar göstermektedir.⁵ ABD'de 2011'de HAI sıklığının araştırıldığı bir çalışmada hospitalize hastaların %4'ünde hastane yatışı süresince en az bir HAI epizodu geliştiği gözlenmiştir.²⁴ Çalışmanın devamında 2015 yılı verileri incelenerek HAI gelişme sıklığının tesisler ve bölgeler arasında değişkenlik gösterdiği ve ABD geneli HAI prevalansının ise %3,2 olduğu saptanmıştır.^{5,25} Avrupa Birliği ülkeleri içerisinde 28 ülkeden akut bakım merkezlerinden ve uzun süreli bakım merkezlerinden hasta verilerinin derlendiği bir çalışmada HAI prevalansının sağlık bakım merkezleri arasında değişkenlik gösterdiği, bu oranın akut bakım merkezlerinde %6,5, uzun süreli bakım merkezlerinde ise %3,9 olduğu gözlenmiştir.²⁶ Gelişmekte olan ülkelere kıyasla daha sık HAI gözlenmektedir. Gelişmekte olan ülkelere HAI prevalansının değerlendirildiği bir havuz çalışmasında HAI oranı %15,5 saptanmıştır.^{5,27}

Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonların odağı akciğerler, gastrointestinal sistem, kardiyovasküler sistem, genitoüriner sistem, santral sinir sistemi, iskelet sistemi olabilmektedir.^{5,22} Çeşitli enfeksiyon klinikleri gözlenebilmekle birlikte CDC tarafından en sık izlenen dört sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon aşağıdaki gibidir.¹

- Kateter İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonu (KİKDE)
- Kateter İlişkili Üriner Sistem Enfeksiyonu (KİÜSE)
- Cerrahi Alan Enfeksiyonu (CAE)
- Ventilator İlişkili Pnömoni (VİP)

Yoğun bakımda yatan hastalarda hem invaziv girişimlerin sıkça uygulanması hem de hasta ilişkili risk faktörlerinin diğer hastalara kıyasla daha yüksek olması nedeniyle HAI gelişme riski daha yüksektir.^{2, 28} Avrupa'da yapılan bir çalışmada yoğun bakımlarda HAI prevalansı %20,6 bulunarak en sık HAI kliniğinin pnömoni olduğu gözlenmişti.²⁹ Sağlık bakımı ilişkili pnömoni hem yoğun bakım ünitelerinde hem de diğer sağlık bakım merkezlerinde oldukça sık gözlenmektedir.^{1, 5, 26, 30}

2.1.1.1 Sağlık bakımı ilişkili pnömoni

Pnömoni; klinik bulgular (ateş pürülan balgam, lökositoz, oksijen ihtiyacı) ile birlikte yeni gelişen akciğer grafisinde infiltrasyon varlığı olarak tanımlanmıştır.² Pnömoni kliniğinin sağlık bakımı ile ilişkilendirilebilmesi için hastane yatışı veya entübasyon üzerinden en az 48 saat geçmesi gerekmektedir.⁵

Güncel kaynaklar mekanik ventilatör gereksinimi olan ve mekanik ventilatör gereksinimi olmayan hastalarda gelişen sağlık bakımı ilişkili pnömoniyi iki farklı klinik durum olarak tanımlamaktadır.^{2, 5} Mekanik ventilatör gereksinimi olmayan hastalarda hastane başvurusu sırasında mevcut olmayan, inkübasyon döneminde olmayan ve başvurudan en az 48 saat sonra gelişen pnömoni kliniği Hastane İlişkili Pnömoni (HİP) olarak tanımlanmıştır.^{2, 5} HİP aspirasyon, kontamine aerosollerin inhalasyonu, bakteriyel translokasyon ve hematolojik yayılım yolu ile gerçekleşebilir.⁵

Sağlık bakımı ilişkili pnömoni gelişimine katkıda bulunan sebeplerin ve önleme stratejilerinin anlaşılmasına rağmen sık görülen sağlık bakımı ilişkili komplikasyon olmaya devam etmektedir.^{2, 31}

2.1.1.1.1. Ventilatör ilişkili pnömoni

Mekanik ventilatör (MV) solunum desteğine ihtiyaç duyan hastaların ağız veya burundan akciğere uzanan tüp yardımı ile akciğerlerin havalandırılmasını sağlayan cihazdır.¹ Solunum yolu enfeksiyonu açısından risk faktörü olarak değerlendirilmektedir.³² Randomize seçilen hastaların dahil edildiği ulusal bir çalışmada mekanik ventilatör gereksinimi olan hastaların %10'unda pnömoni geliştiği gözlenmiştir.³³ Mekanik ventilatör desteğinde olan hastalarda entübasyondan 48 saat veya daha sonra pnömoni kliniği gelişmesi ise VİP olarak tanımlanmıştır.^{2,5}

VİP tanımı CDC tarafınca ventilasyon ile ilişkilendirilebilecek diğer komplikasyonları da kapsayacak şekilde genişletilerek "Ventilatör İlişkili Olay" olarak değiştirilmiştir.^{1 2222} VİP gelişen mekanik ventilatör desteğinde ve sedatize hastalarda klinik bulgular genellikle belirsiz olmakla birlikte ateş, artmış oksijen ihtiyacı, endotrakeal aspirasyonda pürülan materyal varlığı izlenir. Oskültasyonda solunum seslerinde kabalaşma veya raller işitilmektedir. Plevra! effüzyon gelişmişse solunum sesleri azalmıştır.⁵ VİP tanısı radyolojik ve mikrobiyolojik bulgular birlikte değerlendirilerek konulur. X-ray en sık kullanılan görüntüleme yöntemidir ve yeni gelişen infiltrasyonlar izlenir. Laboratuvarıda lökositoz ya da lökopeni görülebilir. Mikrobiyolojik tanı için noninvaziv yöntemlerle (endotrakeal aspirasyon) örnek alınması önerilmektedir.² Alınan sekresyon örneğine boyama, kültür ve antibiyogram yapılmalıdır. Klinik öyküye göre tüberküloz, aspergilloz gibi spesifik enfeksiyonlardan şüphelenilmesi halinde alınan örnek uygun özel kültür ortamına ekilmelidir.^{2,5}

Klinik Pulmoner Enfeksiyon Skoru (KPES) VİP düşünülen hastalarda erken tanı konularak antibiyoterapinin hızlı başlanması amacıyla kullanılan (Bkz. Ek-1) skora sistemidir.³⁴ Testin duyarlılık ve özgüllüğü tanı için belirlenen kesim değerine göre değişmekle birlikte yapılan bir çalışmada kesim değeri 6 alındığında duyarlılığı %43,8 özgüllüğü ise %82,6 bulunmuştur. Kesim değeri daha yüksek alındığında testin özgüllüğü artmakla birlikte duyarlılığı düşmektedir.³⁵ KPES skoru yüksek olan hastalarda mortalite diğer hastalara kıyasla daha yüksek olmakla birlikte mortalite ile KPES arasında direkt ilişki bulunamamıştır.³⁶

2.1.1.1.2. Ventilatör ilişkili pnömoni ve biyofilm yapısı

Son yıllarda yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlar ve biyofilm yapısı üzerine yapılan araştırmalar sayesinde VİP gelişiminde endotrakeal tüp (ET) yüzeyinde biyofilm varlığı predominant faktör olarak değerlendirilmektedir.¹⁷ Entübasyonun ardından tüp yüzeyinde 24 saat içinde biyofilm formasyonu gelişmeye başlamakta ve saatler içerisinde biyofilm yapısında mikroorganizma kolonizasyonu gerçekleşmektedir.^{7,37} 2-7 gün içinde ET yüzeyinin %87,5'i biyofilm ile kaplanırken entübasyondan 10 gün sonra ET yüzeyinin tamamı biyofilm kaplı olarak kabul edilmiştir.^{17, 37} Ekstübe edilen hastalarda ET yüzeyinde biyofilm yapısının incelendiği bir çalışmada 2-10 gün entübe izlenen 40 hastanın entübasyon tüpü elektron mikroskobu ve kantitatif çalışmalar ile incelenmiş ve 30 entübasyon tüpünde en az 50 mg (kuru ağırlık) biyofilm formasyonu ve biyofilm yapısı içerisinde santimetrede yaklaşık 10^6 bakteri hücresi tespit edilmiştir.¹⁰



Resim 1. Endotrakeal Tüp İç Yüzeyinde Biyofilm Yapısı ³⁷

Endotrakeal tüp yüzeyinde biyofilm oluşumunun ardından biyofilm yapısı gastrointestinal sistem florası, hastanın veya sağlık çalışanının cilt florası, çevresel (MV gaz sistemi ve su) kaynaklı mikroorganizmalar tarafından kolonize edilir,^{9,10,37} Medikal ekipman başlangıçta az sayıda mikroorganizma ile kontamine olur entübasyon süresi uzadıkça sekonder kolonizasyon gözlenir ve biyofilm yapısı içerisinde bulunan mikroorganizmalar çoğalır.³⁷

Endotrakeal tüp iç yüzeyine konak savunma mekanizmalarının ulaşamaması, uygulanan antibiyoterapinin biyofilm yapısına penetre olamaması ve biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmaları öldürememesi nedeniyle sesil form korunur,^{9,17} Erken gelişen (entübasyon sonrası 2-5 gün) VİP sıklıkla duyarlı mikroorganizmalarla gelişmektedir ve prognozu daha iyidir. Direnç genlerinin biyofilm yapısı içerisinde mikroorganizmalar arasında aktarılması ve biyofilm yapısının sağlamlaşması nedeniyle geç gelişen VİP (entübasyon sonrası 5 gün ve sonra) sıklıkla dirençli mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir ve yüksek mortalite ile morbidite ilişkilidir.^{17,37}

Sistemik ve inhale antibiyoterapi biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalara etki edemediği için başarılı şekilde tedavi edilen VİP epizodlarından sonra bile sorumlu bakteri biyofilm yapısında varlığını sürdürmeye devam etmektedir.¹⁷ Biyofilm yapısı içerisinde bulunan mikroorganizmalar sıklıkla endotrakeal aspirasyon ile izole edilen etkenlerle benzer olduğundan VİP düşünülen hastalarda endotrakeal aspirasyon ile örnek alınması önerilmektedir,^{2,3,9} Biyofilm eradikasyonu amacı ile elektif ET değişimi önerilmemektedir.¹⁷

2.1.2. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonların klinik önemi

HAI prognozu enfeksiyonun lokalizasyonuna, şiddetine patojene göre değişmekle birlikte tüm HAI tipleri hasta sonlanımına olumsuz yönde etki etmekte, mortalite, morbidite, maliyet artışı ve hastanede yatış süresinde uzamaya neden olmaktadır.^{5,33}

Dirençli mikroorganizmalar ile gerçekleşen sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlar nedeniyle dünya genelinde yılda 700.000 ölüm gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu sayının 2050 yılında 10 milyona ulaşması beklenmektedir.³⁹ Tüm sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlar arasında en yüksek önlenebilir ölüm oranı KİKDE ve VİP'ye aittir.⁴ VİP gelişen hastalarda mortalite %20-

50 arasında değişmekle birlikte 24 çalışmanın dahil edildiği meta-analizde VİP'ye atfedilen mortalite oranını %13 olarak hesaplamıştır.³⁸

2.1.3. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon gelişimine etki eden risk faktörleri

HAI gelişiminde çevresel, hasta ilişkili ve sağlık bakımı ilişkili birçok faktör etkilidir. Sağlık bakımı ilişkili faktörler arasında invaziv işlemler, kullanılan medikal alet ve cisimler (santral kateter, mekanik ventilatör, prostetik maddeler vb.), uygulanan cerrahi prosedürler bulunmaktadır.^{1,5} Kirli klima sistemleri, tesisin fiziksel yerleşimi (örn. birbirine yakın yataklı açık üniteler), personel durumu (hasta-hemşire oranı gibi) ve enfeksiyon kontrol programlarının bulunmaması çevresel faktörler olarak tanımlanmaktadır.^{4,32} Mekanik ventilasyon VİP gelişimi ile en çok ilişkilendirilen risk faktörüdür.⁴

Çok ilaca dirençli organizmalarla gelişen sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonların tedavisi güç olup artmış mortalite, morbidite, uzamış hastane ve yoğun bakım yatışı ile ilişkilendirilmiştir. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyona sebep olan enfeksiyöz ajanın çok ilaca direnç durumunun ön görülmesi hızlı ve uygun antibiyoterapi planlaması açısından önemlidir.

Hastaların izlemi sırasında sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon risk faktörleri, VİP gelişimine etki eden risk faktörleri ve ÇİD organizma ile enfeksiyon düşündüren risk faktörlerinin tanınması (Bkz. Ek-2) hastaların takip ve tedavi planlaması açısından önemlidir.^{1,45}

2.1.4. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon kliniği oluşturan mikroorganizmalar

HAI etkeni bakteriyel, viral ya da fungal patojenler enfeksiyon odağına ve kaynağına göre ekzojen veya endojen olabilmektedir. Hastanın immun sisteminde bozulma olması halinde fırsatçı enfeksiyonlar görülebilir.^{5,7}

Tüm nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde en sık bildirilen patojen *C.difficile*'dir.^{24,25} En sık görülen gram pozitif mikroorganizmalar koagülaz negatif stafilokoklar, *S.aureus* streptokok türleri ve enterokok türleridir.^{5,7} Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon kliniğine en sık

sebebi olan gram negatif mikroorganizmalar ise *Enterobacteriaceae* ailesi (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ve *Enterobacter* türleri), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Burkholderia cepacia*'dır.^{5,7}

HİP ve VİP kliniğinde sıklıkla izole edilen patojenler *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *A. baumannii*, *Streptococcus* türleri ve *Enterobacter* türleridir.⁵ Güncel rehberlerde VİP şüphesi olan hastalardan etkenin izolasyonu için noninvaziv yöntemle (endotrakeal aspirasyon) elde edilen aspiratın semikantitatif kültürü önerilmektedir.² Klasik kültür yöntemleri ve moleküler yöntemler birlikte kullanılarak etkenlerin identifikasyonu sağlanır.^{5,37} Erken ve geç gelişen VİP kliniğinde spesifik patojen dağılımı mevcut olmamasına rağmen geç gelişen VİP epizodlarında genellikle ÇİD mikroorganizmalar görülmektedir.³⁷

Nozokomial pnömoniler sıklıkla gram negatif bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir. *Acinetobacter* suşlarının sıklığı yıllar içerisinde artarken *K. pneumoniae* süreç içerisinde en sık görülen nozokomial pnömoni etkenlerinden olmaya devam etmektedir. Yıllar içerisinde *K. pneumoniae* suşlarında ve *Acinetobacter* suşlarında dirençli suşların oranının artması bu iki patojenin önemini artırmaktadır.^{40,41}

2.1.4.1. *Klebsiella spp.*

Mikrobiyolojik olarak besiyerinde sıklıkla mukoid koloniler oluşturan, hareketsiz, gram negatif basil yapısındadır.¹⁹ *Klebsiella* türleri doğada ve yüzeylerde sıklıkla bulunmakla birlikte insanlarda çeşitli enfeksiyon kliniklerinin gelişimine neden olmaktadır. Yoğun bakımda daha sık olmak üzere sıklıkla nozokomial enfeksiyonların önemli bir kısmından sorumludur.¹⁹ *Klebsiella* türlerinin sebebi olduğu en sık üç klinik sırasıyla üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni ve bakteriyemidir.¹⁹ *Klebsiella pneumoniae* alkoliklerde, alttayatan ciddi hastalığı olan hastalarda toplum kökenli pnömoniye, geriyatrik ve nörolojik defisiti olan hasta grubunda aspirasyon pnömonisine ve sağlık bakımı ilişkili pnömoniiye sebep olabilmektedir.¹⁹

Fimbria, antifagositik kapsül, LPS, membran proteinleri ve sideroforlar gibi birçok virülans faktörü *K. pneumoniae* suşlarının enfeksiyon sırasında konak immün yanıtından korunmasını sağlar.⁴² *K. pneumoniae* suşlarının biyofilm yapabilme yeteneği bakteriyi immün yanıttan ve antimikrobiyallerden korumaktadır.^{37,42,43}

K. pneumoniae'nın bazı virülans genleri biyofilm oluşumunu indüklemektedir. Cps gen kümesi (kapsül), mrk genleri (tip 3 fimbria), wbbM ve wzm (LPS yapısındaki O antijeni) *K. pneumoniae* suşlarında biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır.^{44,42,44}

Kromozomal genlerle kodlanan penisilin spesifik β -laktamaz varlığı yüzünden tüm *K. pneumoniae* suşları ampisiline dirençlidir. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlardan izole edilen suşlar direnç plazmidlerinin aktarılması ile çeşitli antimikrobiyallere direnç kazanmaktadır.¹⁹ Dirençli olmayan suşlarda tedavi seçenekleri birinci kuşak dahil sefalosporinler, penisilin- β -laktamaz inhibitör kombinasyonu, trimetoprim - sülfametaksazol ve aminoglikozitlerdir.¹⁹ Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten ÇİD suşların tedavisinde dördüncü kuşak sefalosporinler ve karbapenemler kullanılmaktadır. Karbapenemaz üreten suşlarda ise tedavi seçenekleri daha sınırlıdır.¹⁹

2.1.4.2. *Acinetobacter* spp.

Mikrobiyolojik olarak nonfermentatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, gram negatif kokobasil yapısındadır. Toprakta ve suda bulunarak hayvan ve insanda enfeksiyon kliniğine yol açmaktadır. İnsan enfeksiyonlarının büyük kısmından *A.baumanii* ve fenotipik olarak *A.baumanii* 'ye benzeyen *A.pitti* ile *A.nasocomialis* sorumludur.¹⁸ Bu suşlar sıklıkla medikal ekipman yüzeyini, sağlık personelinin ellerini kolonize ederek sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlara ve hastane içi salgınlara sebep olmaktadır.^{18,32} *Acinetobacter* türlerinin canlı ve cansız yüzeylerde uzun süre canlı kalabilme yeteneği ve hastaların hastane içi transferleri

Acinetobacter türleri içinde sağlık merkezlerinde *A.baumanii* yayılım gözlenmektedir.¹⁸ türleri 'dir ve yüksek mortalite, yoğun bakım yatışı ve antibiyotik direnci ile ilişkili bulunmuştur.^{5,18,45}

A. baumanii en sık VİP gelişimine sebep olmaktadır. Beş günden uzun süre MV desteği alan hastalarda *A. baumanii*'ye bağlı gelişen solunum yolu enfeksiyonu sıklığı dramatik olarak artmaktadır.¹⁸ Tedavide lokal epidemiyolojik antibiyotik duyarlılık sonuçları ön planda düşünülerek antibiyoterapi planlanmaktadır. *Acinetobacter* türleri sıklıkla intinsik β -laktamaz enzimi bulundurduğundan birinci, ikinci kuşak sefalosporinlere ve penisilinlere dirençlidir.¹⁸ GSBL üreten suşların sıklığı nedeniyle artan karbapenem kullanımı dünya genelinde karbapenem direncinin artışına neden olmaktadır.¹⁸ Pnömoni ve bakteriyemi tedavisinde sülbaktam kullanımı karbapenem, tigesiklin, kolistin ve polimiksin ile benzer etkinliktedir.¹⁸

2.2. Biyofilm Tabakası

2.2.1. Biyofilm tanımı

Biyofilm yapısı ilk olarak Leeuwenhoek'in 17.yüzyılda kendi diş yapısını incelemesi ile gözlenmesine rağmen 1978'e kadar geçerli tanımlama yapılamamıştır.^{12, 44} Costerton ve arkadaşları tarafından 1978'de bakterilerin serbest (planktonik) hücrelerden farklılaşarak yüzeye bağıli matriks yapısı içerisinde besin ve su açısından yeterli ekosistem oluşturması olarak tanımlanan biyofilm yapısının günümüzde güncel araştırma yöntemleriyle analizi sonucunda planktonik mikroorganizmalardan genetik farklılıklarının bulunduğu gösterilmiştir.⁴⁴ Güncel bilgiler ışığında biyofilm yapısı " planktonik (serbest) hücrelerin birbirleri ile iletişim kurarak ve gen transkripsiyonunu indükleyerek fenotipik değişiklik göstermesi, yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanması ve EPS üretmesi" olarak tanımlanmıştır.¹³

2.2.2. Biyofilm yapısı

Biyofilm yapısını oluşturan mikroorganizmalar fizyolojik olarak planktonik formlarından farklılaşarak çok hücreli organizmaları taklit eden karmaşık bir yapı oluştururlar.¹³ Biyofilm yapısının hacimce %15'i mikroorganizmalardan %85'i ise matriks malzemesinden oluşmaktadır.¹²

2.2.2.1. Biyofilm yapısı içerisinde bulunan mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar doğada ve canlı vücudunda planktonik olarak bulunabilmekle birlikte direkt mikroskopik incelemeler ve kantitatif teknikler mikroorganizmaların %99,9' undan fazlasının canlı ve cansız yüzeylere tutunarak biyofilm yapısı içerisinde yaşadığını göstermiştir.^{12,15, 44 46} Bakterilerin ve mantarların pek çoğu biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir.¹⁶

Çeşitli örneklerde biyofilm yapısında mantar, protozoa, mayalar ve algler izole edilmiş olsa da bakteriler üzerinde çalışmalar çoğunluktadır.¹³ Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar sıklıkla yapışmayı kolaylaştırıcı flagella, pili, fimbria ve glikokaliks benzeri yapılara sahiptir.³⁷

2.2.2.2. *Matriks yapısı*

Biyofilm matriks yapısı;

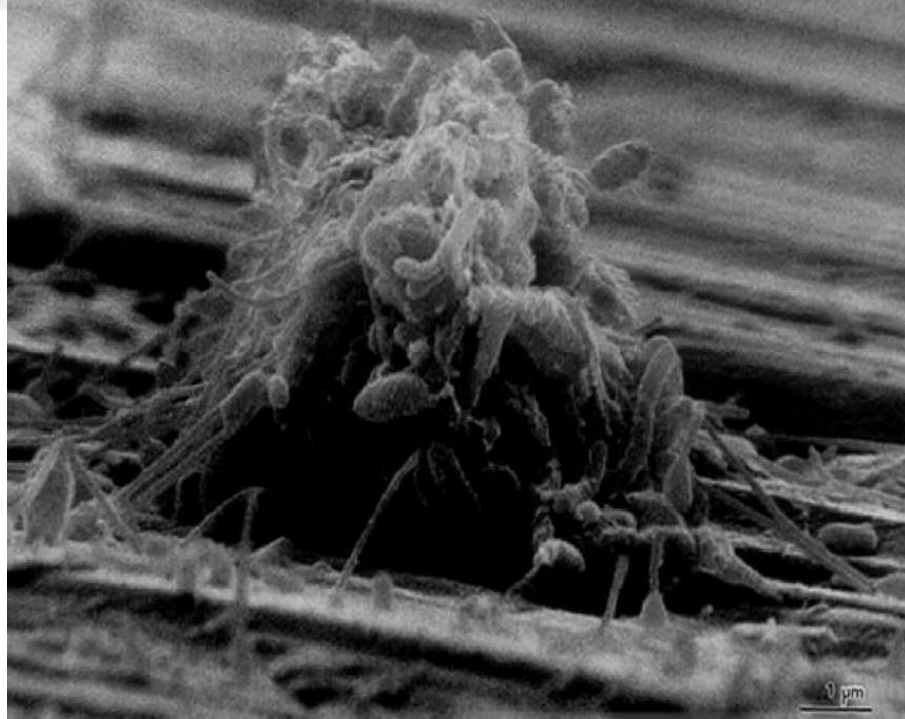
Mikroorganizma tarafından üretilen EPS

Protein

Mikroorganizma veya nötrofil kaynaklı olabilen ekstraselüler DNA (Deoksiribo Nükleik Asit)'dan oluşur.^{1, 3 16}

Biyofilm matriksi içerisinde besinleri ve hücrel atıkları taşıyan su kanalları içeren karmaşık mimari yapıya sahiptir.^{13,16} Bazen konağa ait immunglobulinler de biyofilm yapısı içerisinde bulunabilmektedir.¹⁶

Biyofilm matriksinin büyük kısmını oluşturan EPS mikroorganizmaları dış ortamdan koruyan, besin, su ve elektrolit açısından mikroorganizmaya uygun ortam sağlayan, yüksek oranda hidrate karmaşık kimyasal yapıda bir komplekstir.¹³ Biyofilm derinliklerinde oksijen ve besin konsantrasyonu azalmaktadır. Bu nedenle derin kısımda yer alan mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri azalmış ve bölünme zamanı uzamıştır.³⁷

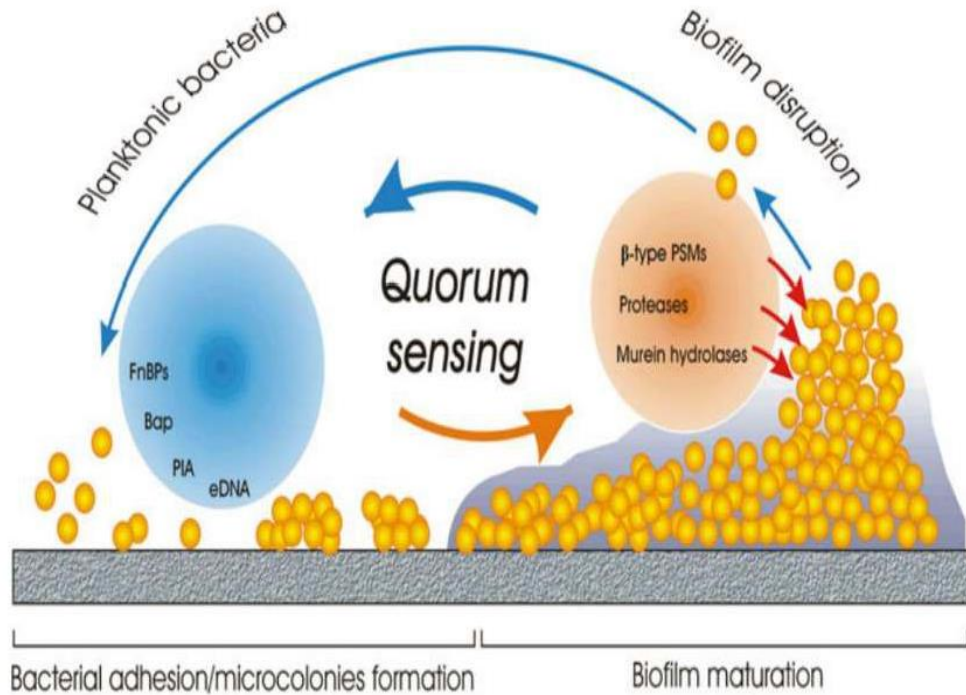


Resim 2. Biyofilm Yapısının Elektron Mikroskop Görüntüsü ¹²

2.2.2.3. Biyofilm yapısının moleküler temeli

Günümüzde biyofilm içerisinde yer alan hücrelerin genetik incelemesi üzerinde durulmaktadır.¹² Biyofilm yapısında bulunan bakteriler ile planktonik bakteriler arasında yaklaşık 45 gen farklılığı bulunmuş olup biyofilm gelişimi artmış mutasyonlar ile ilişkilidir.^{12,15} AlgD, algU, rpoS ve polifosfokinaz sentezini kontrol eden genlerin hepsinin biyofilm oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir.¹²

Büyüyen biyofilm yapısındaki mikroorganizmalar "Quorum Sensing" (QS) adıyla bilinen sinyal mekanizması aracılığıyla birbirleri ile iletişim kurmaktadır.^{15,37} QS otoindüktörlerin seviyesi ile hücreler arası antibiyotik direnci, biyofilm maturasyonu, virülans faktör ilişkili genlerin ekspresyonu regüle edilir ve bu regülasyon mikroorganizmada birçok fizyolojik değişikliğe sebep olur.^{15,37} Gram negatif bakteriler biyofilm yapısı içerisinde birbirleri ile iletişim kurmak için açıl homoserin laktan salınımı yaparken gram pozitif bakteriler oligopeptid molekülleri salar. *P.aeruginosa* biyofilm yapısı ile ilişkili QS molekülü olan N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserin molekülünün bakterinin virülansını ve konak immun yanıtını arttırdığı bilinmektedir.^{15,37}



Şekil 1. QS Sinyalleri ile Biyofilm Oluşumunun İndüksiyonu ³⁷

2.2.3. Biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu mikroorganizmanın yüzeye tutunması (adezyon) ile başlayan dinamik bir süreçtir.¹⁵ Yüzeye tutunma mikroorganizma-yüzey arasındaki elektrostatik etkileşimler, bakteriyel hareketlilik ve çekme kuvveti ile gerçekleşir.³⁷ Geçici tutunma aşamasında mikroorganizma yüzeyden temizlenemezse biyofilm matriks komponenti EPS üretimi başlar ve geri dönüşsüz bağlanma (agregasyon), olgunlaşma (maturasyon) ve ayrılma (detachment) aşamaları gerçekleşir.^{1, 51, 73, 7}

2.2.3.1. Yüzey şartlandırma

Çeşitli organik ve inorganik maddeler bakterilerin yüzeye tutunmasını etkilemektedir.¹³ Bakteri hücreleri çok farklı tipte yüzeylere yapışabilir. Lateks yüzeyler, etilen propilen, klorinated polivinil klorid, propilen, çelik, plastikten arındırılmış poliivinil klorid, polietilen ve cam yüzeyde biyofilm gelişebilmektedir. Lateks ve diğer plastik yüzeylerin biyofilm gelişimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir.¹³ Yapılan çalışmalarda müsin glikoprotein içeren biyofilm yapısındaki hücre agregatlarının cam yüzeyde gelişen biyofilm yapısındaki mikroorganizmalara kıyasla antibiyotiklere daha dirençli olduğu gösterilmiştir.¹³

2.2.3.2. Geçici bağlanma (adezyon)

Bakteri hücrelerinin yüzeye ilk hareketi ve gen dönüşümlü bağlanma mikroorganizmaların çökmesi ile gerçekleşmektedir. Bakterileri yüzeye taşıyan sıvı içerisinde elektrostatik ve fiziksel etkileşimler aracılığı ile bakteri hücresi ve yüzey arasında bir denge kurulur. Bu aşamada planktonik bakteriler ve bağlanmış mikroorganizmalar denge halinde bulunmaktadır.¹³

2.2.3.3. Geri dönüşsüz bağlanma (agregasyon)

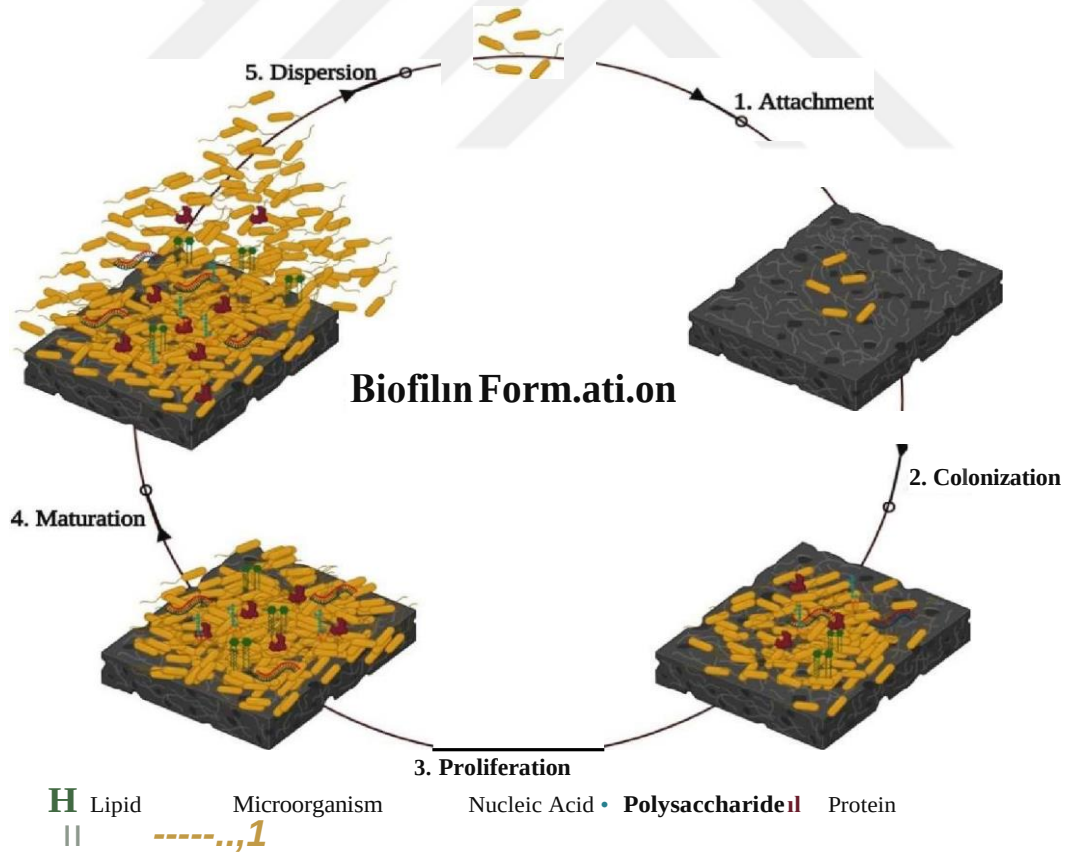
Yüzeye gen dönüşümlü bağlanmış olan bakteri hücreleri membran bağımlı sensör proteinlerinin indüklenmesi ile hücre-hücre ve hücre-yüzey arasında tutunmayı sağlayan EPS üretmeye başlarlar.¹³ Geri dönüşsüz bağlanma aşamasında yüzen ve bağlanan mikroorganizmalar arasında bir denge mevcuttur.³⁷

2.2.3.4. Olgunlaşma (maturasyon)

Tutunmuş olan mikroorganizmalar büyür, bölünür ve biyofilm yapısının temel organizasyonel ünitesini oluşturur. Bu aşamada planktonik başka mikroorganizmalar biyofilm yapısına dahil olabilir. Bir bakterinin yüzeyde kolonizasyonu (primer kolonizasyon) diğer bakterilerin de yüzeyi kolonize etmesini (sekonder kolonizasyon) kolaylaştırır.¹³ Bu aşamada hücreler yeterli bakteri varlığını belirlemek ve belirli fenotip dönüşümü başlatmak için QS molekülleri salgılar.¹⁷

2.2.3.5. Ayrılma (detachment)

Biyofilm yüzeyinde gerçekleşen türbülans akımının biyofilmden kopmalara ve farklı bir yüzeye transferine sebep olduğu düşünülmektedir. Güncel çalışmalar biyofilm yapısındaki hücrelerin çeşitli mediatörler aracılığı ile aktif bir şekilde çözülme ve dağılmayı düzenlediğini göstermiştir.¹³ Biyofilm yapısından koparak veya çözünerek ayrılan mikroorganizmalar farklı dokuda yeni biyofilm oluşumuna sebep olur.¹⁵



Şekil 2. Biyofilm Yapısının Oluşum Aşamaları ⁴⁷

2.2.4. Biyofilm yapısı ve enfeksiyonlar

Mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm yapısı canlı vücudunda çoğunlukla koruyucu işlev görmektedir. Gastrointestinal sisteme yerleşen kommensal bakterilerin bağırsak epiteline tutunması gıda kaynaklı patojenlere karşı bariyer görevi görmektedir.¹³ Bununla birlikte biyofilm yapısının immunsuprese ve vücudunda yabancı cisim bulunan (protez kalp kapağı, ortopedik implantasyonlar, kalıcı kateter vb.) hastalar başta olmak üzere tüm hastalarda enfeksiyon kaynağı olabildiği ortaya çıkmıştır.¹³

Planktonik mikroorganizmaların neden olduğu akut enfeksiyon klinikleri yüzyıllar içerisinde geliştirilen aşılar ve antibiyotikler ile önemli ölçüde kontrol altına alınırken biyofilm ilişkili enfeksiyon kliniği günümüzde önem kazanmıştır.⁴⁸ Endokardit, osteomyelit, sinüzit, üriner sistem enfeksiyonu, kronik prostatit, periodontit ve kistik fibrozis hastalarında gelişen kronik akciğer enfeksiyonlarının biyofilm ilişkili olduğu bilinmektedir.^{16,48} Medikal ekipman ilişkili gelişen pek çok nozokomial enfeksiyonun patogeneğinde biyofilm oluşumu yer almaktadır.^{16,48} Biyofilm formasyonu kronik inflamasyona ve sonucunda doku hasarına sebep olmaktadır.¹⁶ Antibiyoterapiye dirençli ve konak bağışıklık sisteminden kaçabilen biyofilm formasyonunun sebep olduğu kronik inflamasyonda kolonizasyonun aksine immun cevap ve patolojik değişiklik gözlenir.¹⁶

2.2.4.1. *Biyofilm yapısı ilişkili enfeksiyon patogenezi*

Konak vücudunda biyofilm oluşum aşamaları net olarak anlaşılamamakla birlikte biyofilm varlığının konakta enfeksiyon kliniği oluşturmasını açıklayıcı genel kabul gören dört mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmalar;

Hücre veya hücre gruplarının biyofilm tabakasından ayrılması

Endotoksin üretimi

Konak immün yanıtına direnç

Dirençli organizmaların oluşumu için uygun niş oluşumudur. ^{12 49}

Biyofilm yüzeyinde akım hızının, yönünün değişmesi biyofilm tabakasinda erozyona neden olabilmektedir. Yüzeyde substrat konsantrasyonunda değişiklikler biyofilm rezolüsyonuna ve biyofilm yapısından hücre ayrılmasına sebep olabilmektedir. Yapılan

çalışmalarda açıl homoserin lakton molekülünün biyofilm yapısını ve ayrışmasını etkileyebildiği gözlenmiştir. Hangi mekanizma ile gerçekleşirse gerçekleşsin biyofilm yapısından ayrılan mikroorganizmalar tutundukları dokuda enfeksiyon kliniğine sebep olmaktadır.^{1, 2 4950}

Biyofilm tabakası içerisine yerleşen gram negatif bakteriler endotoksin salınımına neden olarak konakta immun yanıtı tetikleyebilir.^{12 9 4} Hemodiyaliz kateter yüzeyindeki biyofilm tabakasındaki bakteri sayısının endotoksin düzeyi ile korele olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur.⁵¹ Bununla birlikte endotoksin düzeyi ve etkileşimi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.^{12 49}

Biyofilm yapısındaki EPS ile mikroorganizmalar fagositozdan korunurken opsoninler ve kompleman sistemi biyofilm tabakası içerisinde etkin değildir.^{52 53} Ward ve arkadaşları hayvan immun sisteminin peritoneal implant yüzeyindeki biyofilm yapısında bulunan bakterilerin büyümesini durduramadığını göstermiştir. Aşılanmış olan hayvanların aşısız hayvanlara kıyasla 1000 kat antikor titresine sahip olmasına rağmen antikorların bakteri hücrelerine ulaşamadığı gözlenmiştir.^{12 49 54}

Biyofilm tabakası içerisinde bakteriler arasında konjugasyon ve plazmid aracılığı ile gen aktarımı gerçekleşir. Konjugasyon ile gen aktarımı aynı tür bakteriler arasında gerçekleşebildiği gibi farklı tür bakteriler arasında da gelişebilir. Antimikrobiyal dirençten sorumlu plazmidlerin aktarımı ile antibiyotik direnci biyofilm yapısı içerisinde türler arasında yayılır.^{55 56} Biyofilm yapısı içerisinde farklı türler arasında gerçekleşen konjugasyon oranı aynı tür bakteriler arasında planktonik formda gerçekleşen konjugasyondan çok daha fazladır.^{12,9}

2.2.4.2. *Biyofilm yapısı ilişkili hastalıkların sınıflaması*

Biyofilm ilişkili hastalıklar;

Yabancı cisim ilişkili biyofilm enfeksiyonları

Yabancı cisim ilişkili olmayan biyofilm enfeksiyonları

Biyofilm ilişkili cihaz fonksiyon bozukluğu

olmak üzere üç katede değerlendirilmektedir.⁴⁸

2.2.4.2.1. *Yabancı cisim ilişkili biyofilm enfeksiyonları*

Medikal implantlar (kalp pilleri, protez kalp kapakları, damar protezleri, protez eklemler vb.) modern tıpta tedavinin ayrılmaz parçası haline gelmiştir. Bununla birlikte medikal ekipman kullanımı yüksek biyofilm ilişkili enfeksiyon riski ile birliktedir.⁴⁸ Mikroorganizmaların medikal ekipmanın iç veya dış yüzeyine tutunması ile yabancı cisim enfeksiyonları gelişir.¹⁶ Medikal ekipman kullanımı sonucu gelişen enfeksiyonlarda biyofilm yapısının önemi bir rolü olduğu açıktır.^{12, 49}

Ekipmanın implantasyonunun ardından 24 saat içerisinde yabancı cisim ilişkili enfeksiyon gelişiminin ilk basamağı olan kolonizasyon süreci başlar. Kolonize olan mikroorganizma endojen veya ekzojen kaynaklı olabilir. Konak tarafından üretilen koşullandırma faktörleri (trombosit, plazma ve doku proteinleri) biyofilm yapısını güçlendirebilir. Medikal ekipman yaşamsal organların fonksiyonunu kurtarma amacıyla implante edildiğinde konak hücrelerinin ve mikroorganizmaların ulaşmak için rekabet ettiği alana dönüşür.⁴⁸

2.2.4.2.2. *Yabancı cisim ilişkili olmayan biyofilm enfeksiyonları*

Yabancı cisim varlığı biyofilm gelişimini kolaylaştıran önemli bir faktör olmakla birlikte mukoza ve dokularda biyofilm oluşumu ile gelişen birçok enfeksiyon kliniği tanımlanmıştır.^{16, 48} Kronik enfeksiyonların %80' den fazlası biyofilm ilişkilidir.¹⁵ Kistik fibrozis hastalarında gelişen kronik havayolu enfeksiyonu, tüberküloz, kronik yara enfeksiyonları, kronik otitis media, kronik sinüzit, endokardit, osteomyelit doğal yüzeylerde biyofilm oluşumu ile gelişen kronik enfeksiyonlara örnek verilebilir.⁴⁸

Doğal kapak endokarditi gibi yüksek akımın mevcut olduğu klinik durumlarda biyofilm tabakasından ayrılma ve mikrokolonilerde kopma riski mevcuttur. Kalp kapakçıkları üzerindeki biyofilm tabakasında gerçekleşen kopma kapiller yatakta enfektif emboli riski doğurur. Felç veya ciddi pulmoner emboliye sebep olabilir.¹²

2.2.4.2.3. *Biyofilm ilişkili medikal ekipmanın fonksiyon kaybı*

Yabancı cısmı reaksiyonu tıbbi bir cihazın implantasyonunu takiben başlayan, makrofajlar ve dev hücreler tarafından gerçekleştirilen inflamatuvar yanıttır. Biyomateryal yüzey özellikleri cihaz implantını takiben ilk dört hafta yabancı cisim reaksiyonunu modüle etmede önemli rol oynasa da tıbbi ekipmanın insan vücudunda bulunduğu süre boyunca yabancı cisim reaksiyonu devam eder.⁴⁸

Biyofilm yapısı ile gerçekleşen yabancı cisim reaksiyonu biyomateryalin fonksiyon kaybına neden olabilmektedir. Protez eklem yetmezliği, intravasküler kateter disfonksiyonu, beyin omurilik sıvısı şant arızası ve kalp pili elektrotlarında kimyasal bozulma Biyofilm ilişkili medikal ekipmanın fonksiyon kaybına örnek verilebilir.⁴⁸

2.2.5. **Biyofilm yapısı ve antibiyotik direnci**

Biyofilm yapısına dönüşebilme yeteneği bakterinin dezenfektanlardan, antibiyotiklerden ve vücudun immun sistem hücrelerinden korunmasını ve uygunsuz dış ortam koşullarında hayatta kalabilmesini sağlar.^{12 15 16 43} Bu sebeple klinik olarak önemli birçok enfeksiyon biyofilm yapımı ile gerçekleşir. Biyofilm yapısı içerisindeki bakterilerde bazı antibiyotiklere karşı terapötik konsantrasyonun 100-1000 kat arttığı gösterilmiştir.^{15 17} Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizma toplulukları ve onların antimikrobiyallere direnci yetersiz tedaviye neden olarak enfeksiyon persistansına ve nüksüne neden olmaktadır.^{14 15}

Biyofilm yapısı içerisinde antimikrobiyal direnci sıklıkla multifaktoriyeldir ve aşağıda belirtilen direnç mekanizmalarından birinin veya birkaçının birlikte bulunması ile gelişebilir.^{12 15 43}

2.2.5.1. *Antimikrobiyal ajanın biyofilm matriksine penetrasyonunun gecikmesi*

Costerton ve arkadaşları tarafından 1981'de biyofilm tabakasındaki EPS yapısının difüzyon bariyeri oluş turma, kimyasal reaksiyon ve nötralizasyon gibi çeşitli mekanizmalar ile bakterileri antimikrobiyallerden koruduğu öne sürüldü.¹³ Antimikrobiyal ajanın mikroorganizmaya etki edebilmesi için biyofilm tabakasını aşması gerekir.¹²

EPS ile antimikrobiyal arasındaki elektrik yükü, antimikrobiyalın molekül büyüklüğü ve EPS viskozitesi nedeniyle antimikrobiyallerin biyofilm içinden geçişi gecikebilir veya engellenebilir.^{13, 3, 7, 43} EPS tabakası ayrıca mikroorganizmaları IFN-y ilişkili ölümden korur.¹⁵

Moleküllerin transportunu kısıtlayan EPS tabakası difüzyon bariyeri olarak biyofilm matriksinde yer alır.^{12,15} Yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* 'dan elde edilen %2' lik aljinat süspansiyonunun gentamisin ve tobramisin geçişini inhibe ettiği ve bu inhibisyonun aljinat liyaz ile ortadan kaldırıldığı gözlemlenmiştir.⁵⁷ Çeşitli antimikrobiyallerin sentetik ve doğal aljinat tabakasından difüzyonunun incelendiği başka bir çalışmada ise betalaktam grubu antibiyotiklerin aminoglikozidlere kıyasla aljinat tabakasını çok daha hızlı geçtiği saptanmıştır.⁵⁸

2.2.5.2. *Biyofilm oluşturan organizmaların değişken büyüme paterni*

Güncel bilgiler ışığında biyofilm yapısının tek bir mikroorganizmadan oluşmadığını birden çok mikroroganizmanın kombinasyonu olduğunu söyleyebiliriz.¹⁷ Besin, oksijen kullanımına ve metabolik aktiviteye göre yerleşim gösteren mikroorganizmalardan yavaş metabolik aktivitesi olanlar antimikrobiyallere daha az hedef olur ve dirençten sorumludur.^{12, 15} Hücre büyüme hızlarının değerlendirildiği bir çalışmada biyofilm yapısında en yavaş büyüyen *E.coli* suşlarının antimikrobiyallere en dirençli olduğu gözlenmiştir.⁵⁹ Başka bir çalışmada biyofilm içerisindeki *S. epidermidis* suşlarının çoğalma hızının duyarlılıkla yüksek oranda ilişkili olduğu ve hızlı çoğalan hücrelerde siprofloksasinle inaktivasyon gerçekleştiği gözlenmiştir.⁶⁰

Gram negatif bakteriler biyofilm yapısı içerisinde sigma faktörleri sentezleyerek besin sınırlamasına ve diğer çevresel streslere yanıt verir. *E. coli*'de, rpoS genlerinin kontrolü altındaki sigma faktörleri stresin etkilerini hafifleten genlerin transkripsiyonunu düzenler. Organizmanın yavaş büyümesi sırasında rpoS aktive olduğundan , besin sınırlaması veya toksik metabolitlerin birikmesi gibi bakteri büyümesinin yavaşlamasına neden olan koşulların biyofilm oluşumunu desteklediği görülmektedir.¹² Yapılan bir çalışmada oksijen basıncı azaldıkça *E.coli* hücrelerinin aminoglikozitlere karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur.⁶¹ Oksijen açlığı çeken hücreler tarafından antimikrobiyalın hücre içine alımının azaldığı düşünülmektedir.¹²

2.2.5.3. Diğer fizyolojik değişiklikler

Biyofilm oluşumu sıklıkla antibiyotik direnci olan mikroorganizmalar tarafınca gerçekleştirilir ve biyofilm tabakası içerisinde dirençten sorumlu genler mikroorganizmalar arasında aktarılır.¹⁵ Persiste hücreler olarak adlandırılan dirençli mikroorganizmalar hayatta kalmaya uyum sağlamış, özelleşmiş hücrelerdir.¹³

QS sinyalleri ile effluks pompa proteinlerinin düzenlenmesi antimikrobiyal ajanların nötralizasyonunu ve uzaklaştırılmasını sağlar.¹⁵ Biyofilm yapısındaki mikroorganizmaların bir kısmı antimikrobiyalleri transport sistemleri ile dışarı atmaya ya da hücre membranlarında bu antimikrobiyalleri bağlayarak inaktive etmeye uyum sağlamışlardır.¹³

Biyofilm yapısı içerisinde artmış konjugasyon, plazmid aracılı genetik materyalin transferi bakteriler hatta türler arasında gerçekleşerek antibiyotik direnci gibi özellikler aktarılabilir. Biyofilm yapısı mikrororganizmalar arasında direnç ilişkili genlerin aktarıldığı uygun ortamı oluşturur.¹³

Biyofilm yapısının yüzey özellikleri ve mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler de biyofilm yapısının antimikrobiyallere direncine katkı sağlamaktadır.¹³ Biyofilm yüzeyinin girintili çıkıntılı olması yapı içerisindeki mikroorganizmaların inaktivasyonunu güçleştirmektedir.¹³ Biyofilm yapısındaki *P.aeruginosa* hücrelerinde artmış katalaz üretiminin hidrojen peroksit içeren dezenfektanlara karşı direncin artması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Artmış betalaktamaz üretimi de biyofilm yapısı içinde betalaktam grubu antibiyotiklere karşı artmış dirençle ilişkilidir.¹³

2.2.6. Biyofilm oluşumunun klinik önemi

Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar hem fizyolojik özellikleri hem de konak savunma sistemlerinden kaçış mekanizmaları açısından planktonik hücrelerden farklıdır.⁴⁸ Mikroorganizmalar biyofilm yapısı içerisinde besin yönünden kısıtlı ortamda hareketsiz bulunmakla birlikte bu ortam mikroorganizmaları antibiyotiklere, toksinlere, antikorlara ve konağın hem doğal hem de edinilmiş immün sistemine karşı korumaktadır.¹⁶ Ekosistem içerisinde ve endüstriyel alanda (endüstriyel borular, su hazneleri gibi) dezenfektanlara direnç gösteren biyofilm yapısı konakta antibiyoterapiye ve immün sisteme dirençli yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlara ve kronik enfeksiyonlara sebep olmaktadır.⁴⁴

Biyofilm yapısındaki bakteriyel antijenler antikor üretimini uyarır. Bu antikorlar enfeksiyonu biyofilm yapısına nüfuz edemez ancak biyofilm yüzeyinde immun kompleks oluşumuna ve sonucunda kolonize dokuda hasara neden olur. Biyofilm komşuluğundaki dokularda immunkompleksler ve nötrofiller aracılığı ile doku hasarı gelişir.⁴⁸ Biyofilm yapısı yanık enfeksiyonları, kronik otitis media, kronik sinüzit, diş çürüğü, prostetik eklem enfeksiyonları gibi birçok kronik enfeksiyona ve kronik inflamasyona neden olur.¹⁵

Kalıcı cihazlarda gelişen biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisi zor ve antibiyoterapiye dirençli olduğundan genelde kronik enfeksiyon gelişir. Ayrıca bu cihazların kolonizasyonu, bozulmalara, tıkanmalara ve fonksiyon kaybına neden olarak tekrarlayan girişimlere sebep olur.¹³

Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar endojen veya ekzojen tek patojen ilişkili olabilmekle birlikte sıklıkla polimikrobiyaldir. Biyofilm tabakasının korunaklı yapısı nedeniyle sorumlu patojen sıklıkla izole edilemez.⁴⁸ Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar sıklıkla yavaş patojenik pateme sahiptir. Antibiyotik tedavisine başlangıç yanıtı görülebilse de biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar antibiyoterapiden korunduğu için relapslar görülür.⁴⁸

3. GEREC VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Ekim 2019 – Haziran 2021 tarihleri arasında yapıldı.

3.2. Etik Kurul Onayı

Çalışmayla ilgili olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 12.06.2019 tarihinde 2019/14-41 karar numarası ile etik kurul onayı alındı (Bkz. Ek-3).

3.3. Hasta Alımı

Ekim 2019-Haziran 2021 tarihleri arasında DEÜTF Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen trakeal sekresyon örneklerinin kültür sonuçları değerlendirildi. *Acinetobacter* spp veya *Klebsiella* spp suşlarının alındığı hastaların klinik bilgileri, konsültasyon notları, diğer test sonuçları, verilen tedaviler incelenerek uygun hastalar çalışmaya dahil edildi.

3.3.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

Trakeal sekresyon örneğinde üreme miktarının 10^5 CFU/ml ve üzerinde olması
Hastanın DEÜTF Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesi'nde (Anestezi Yoğun Bakım, Dahiliye Yoğun Bakım, Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım ve Nöroloji Yoğun Bakım) yatıyor olması

Hastanın 18 yaş ve üzerinde olması

Yoğun bakım yatışı ile örnek alımı arasında 48 saat ve daha uzun süre geçmesi

Entübasyon ile örnek alımı arasında 48 saat ve daha uzun süre geçmesi

Klinik Pulmoner Enfeksiyon Skorunun 6 üzerinde olması (Bkz. Ek-2)

3.3.2. Çalışmadan dışlama kriterleri

Trakeal sekresyon dışında solunum yolu örnekleri

Trakeal sekresyon örneğinde iki veya daha fazla sayıda farklı mikroorganizma izole edilmesi

DEÜTF Hastanesi'nde yukarda belirtilen bölümler dışında yataklı serviste yatan hastalar

Trakeostomi ile ventile edilen hastalar

3.3.3. Kaydedilen veriler (Bkz. Ek-4)

Demografik veriler (yaş, cinsiyet)

KPES skoru

HAI risk faktörleri

VİP risk faktörleri

ÇİD organizma ile enfeksiyon risk faktörleri

VİP epizodu sonlanım bilgileri

30 günlük hasta izlemi sonlanım bilgileri

3.3.4. İzolatların toplanması ve saklanması

Çalışma kriterlerini karşılayan örnekler DEÜTF Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda pasajlanarak çalışma başlangıcına kadar -20 °C'de boncuklu stok besiyeri (Orbak, Türkiye) içerisinde saklandı.

Hastalardan elde edilen örnekler çalışmaya alındı. Antimikrobiyal duyarlılık testleri kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC25922 ve biyofilm testleri kontrol suşu olarak *K.pneumoniae* ATCC700603 kullanıldı.



Resim 3. Boncuklu Stok Besiyeri

3.4. Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri

3.4.1. İzolatların canlandırılması

-20 °C' de saklanan boncuklu stok besiyerlerinden tek boncuk alınarak kanlı agar (BD, Almanya) yüzeyine ekim yapıldı. 35 °C'de 24 saat inkübe edilerek agar yüzeyinde tek koloni elde edildi.

3.4.2. Bakteri tanımlama yöntemleri

DEÜTF Hastanesi Merkez Bakterioloji Laboratuvarı ' nda solunum yolu örneklerinin tanımlanmasında uygulanan standart konvansiyonel yöntemlere ek olarak otomatize kütle spektrometri MALDİ-TOF (Biomerieux, Fransa) kullanıldı.

3.5. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* suşlarının antimikrobiyal duyarlılığı e-test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırıldı. Mikroorganizma üremesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu saptanarak kaydedilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) standartlarına göre değerlendirildi.⁶²

3.5.1. E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Katı besiyerinde MİK değerinin saptanabilmesi için E-test yöntemi kullanıldı. 0.5 McFarland yoğunlukta hazırlanan bakteri solüsyonu Mueller Hinton agar (BD, Almanya) yüzeyine steril bir eküvyon yardımıyla tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yayıldı. Agar yüzeyine test edilen her bakteri için seftazidim, meropenem ve amikasin antibiyotiklerinin belli konsantrasyonlarını içeren e-test şeritleri yerleştirilerek 35°C'de 24 saat inkübe edildi.

Şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta kaydedilerek belirlenen MİK değerleri EUCAST uluslararası standartlarına göre değerlendirildi.^{62,63}

3.5.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde, test edilecek antimikrobiyal ajan 96'lı mikrotipli kuyucuklarında azalan konsantrasyonlarda bulunur. Test edilen suşun üremesini gözle görülebilir olarak inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenir.⁶²

Klebsiella spp örnekleri seftazidim, meropenem, amikasin, kolistin, fosfomisin ve tigesiklin için test edildi.

Acinetobacter spp örnekleri meropenem, amikasin ve kolistin için test edildi. Mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde seftazidim, fosfomisin ve tigesiklin antibiyotiklerinin *Acinetobacter spp* suşları için kullanımı önerilmediğinden test edilmedi.

3.5.2.1. Antibiyotiklerin hazırlanması ve saklanması

Kullanılan antibiyotikler

Kolistin (Sigma Aldrich, ABD)

Seftazidim (Sigma Aldrich, ABD)

Fosfomisin (Sigma Aldrich, ABD)

Amikasin (Sigma Aldrich, ABD)

Meropenem (Biosynth Carbosynth, İngiltere)

Tigesiklin (Biosynth Carbosynth, İngiltere)

- Antibiyotikler 20 mg tartılarak $V = w \times P / c$ formülüne göre test edilecek konsantrasyonun 10 katı yoğunlukta stok çözeltisi hazırlandı. (V: Sulandırıcı hacmi, w: Antibiyotik ağırlığı, P: Antibiyotik potensi, c: İstenilen konsantrasyon)
- Her antibiyotik için nihai konsantrasyon EUCAST uluslararası standartlarına göre belirlenmiş MİK değerleri göz önünde bulundurularak hesaplandı.
- Hazırlanan stok solüsyonu tekrarlayan kullanımlar için 1,5 ml hacminde epandorflar içerisine 0,1 ml hacimde konularak -20 °C' de donduruldu.

Tablo 1. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Antibiyotik Adı	Antibiyotik Kütlesi (mg)	Potens (ug/mg)	Hacim (ml)	Stok Solüsyon (ug/ml)	Kat Sayı	Test Solüsyonu (ug/ml)
Meropenem	20	980	1,914	10240	10	1024
Amikasin	20	730	2,852	5120	10	512
Kolistin	20	50	0,195	5120	10	512
Tigesiklin	20	980	15,313	1280	10	128
Seftazidim	20	900	3,516	5120	10	512
Fosfomisin	20	993	0,485	40960	10	4096

3.5.2.2. *Müller Hinton Broth sıvı besiyerinin hazırlanması*

Katyon Ayarlı Müller Hinton Broth (KAMHB) üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde hazırlanarak otoklavlandı. Kontaminasyonu önlemek için steril cam tüpler içerisinde parafilm ile kapatılarak +4°C de saklandı.

3.5.2.3. *İnokulumun hazırlanması*

Kanlı agarda 24 saat inkübasyon sonucunda elde edilen koloniler 0.5 McFarland bulanıklık standardına hazırlandı. Hazırlanan solüsyon KAMHB ile 1:1000 oranında dilüe edildi.

3.5.2.4. *Bakteri inokülasyonu öncesi hazırlık*

1. -20 °C' de saklanan stok antibiyotik çözeltilerinin kullanım öncesinde oda sıcaklığında çözünmesi beklendi.
2. Oda sıcaklığında çözünen 0,1 ml antibiyotik stok çözeltisi üzerine 0,9 ml steril su eklendi. Test için uygun konsantrasyonda 1 ml antibiyotik çözeltisi elde edildi.
3. Her plakada sekiz suşun aynı antimikrobiyale duyarlılığı değerlendirildi.

3.5.2.5. *Bakteri inokülasyonu*

1. 96'lı mikropłakanın tüm kuyucuklarına 0,1 ml KAMHB koyuldu.
2. Mikropłakanın ilk sütunu üreme kontrol sütunu olarak ayrıldı ve bu sütuna antibiyotik solüsyonu eklenmedi.
3. Her satırın ikinci kuyucuğuna hazırlanmış olan antibiyotik solüsyonundan 0,1 ml koyuldu.
4. İkinci kuyucukta elde edilen 0,1 ml antibiyotik test solüsyonu + 0,1 ml KAMHB karışımı otomatik pipet yardımı ile homojenize edildikten soma karışımdan 0,1 ml pipete geri alındı.
5. İşlem somasında ikinci kuyucukta antibiyotik konsantrasyonu 1:2 oranında dilüe edilmiş oldu .
6. Pipete alınan antibiyotik solüsyonu karışımı bir somaki kuyucuğ a eklenerek işlem tekrarlandı.

7. İşlem en son kuyucuğa kadar tekrarlandı.
8. Son kuyucuktan alınan O, 1 ml'lik karışım dışarıya boşaltıldı.
9. İşlem tüm satırlar için tekrarlandı.
10. Bu sayede 96'lı mikrolakanın her satırında test edilen antibiyotiğin yarı konsantrasyonda azalan derişimleri elde edildi.
11. Her satırın ilk kuyucuğundan başlanarak satırdaki tilin kuyucuklara 0,1 ml bakteri süspansiyonu inoküle edildi.
12. Sterilite kontrol kuyucuğu olan son kuyucuğa inokülasyon yapılmadı.
13. 96'lı mikrolaka 35 °C'de 16 saat inkübe edildi.

3.5.2.6. *MIK değerlerinin belirlenmesi*

İnkübasyon sonrası mikrolakalar çıplak gözle değerlendirildi. Her satırda üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon değeri MİK olarak belirlendi. MİK değerleri uluslararası EUCAST standartlarına göre değerlendirildi.⁶²

4. Biyofilm Üretim Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm suşların biyofilm üretim kapasitesi String Testi (ST), Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi (KKAY), Tüp Metodu (TM) ile kalitatif olarak, Doku Kültür Plak Metodu (DKPM) ile ise kantitatif olarak test edildi. Test sonucunda biyofilm üreticisi olarak belirlenen suşlar biyofilm pozitif, biyofilm üretimi yapmayan suşlar ise biyofilm negatif olarak adlandırıldı.

Tüp metodu ve doku kültür plak metodu ile biyofilm üretimi yapan suşların biyofilm üretimi derecelendirilerek değerlendirildi.

3.6.1. String testi (ST)

%5 koyun kanı içeren katı besiyerinde yetişen koloniler öze ile agar yüzeyinden alınırken kopma mesafesi ölçüldü. Kopma mesafesi 5 mm'den uzun olan suşlar biyofilm pozitif, 5 mm'den daha kısa olan suşlar ise biyofilm negatif olarak tanımlandı.⁶⁴



Resim 4. String Testi ⁶⁴

3.6.2. Kongo kırmızısı agar yöntemi (KKAY)

Freeman ve arkadaşlarının⁶⁵ 1989'da Stafilokok suşlarında biyofilm varlığının araştırılması için geliştirdikleri Kongo Kırmızısı Agar yöntemi günümüzde halen kolay uygulanabilmesi nedeniyle biyofilm varlığının araştırılmasında uygulanmaya devam etmektedir.^{42, 66, 67}

Yöntem için litrede 10 g agar, 50 g süktroz, 37 g beyin-kalp infüzyon buyyonu ve 0.8 g Kongo kırmızısı içerecek şekilde özel agar bazlı besiyeri hazırlandı. Kongo kırmızısı konsantre sulu çözelti olarak hazırlanarak 121 °C' de otoklavlandı. 55 °C'ye soğutulduktan sonra diğer malzemelere eklendi.

Kanlı agarda çoğaltılan izolatlar ve kontrol suşları, Kongo kırmızısı agarlara tek koloni olarak edildi. 35 °C' de 24 saat inkübasyonun ardından izolatlar koloni morfolojisine göre kalitatif olarak değerlendirildi. Test her suş için 3 kez tekrarlandı.

Acinetobacter spp suşlarından kırmızı, kristal kıvamında olanlar biyofilm pozitif olarak değerlendirilirken , pembe/beyaz koloniler zayıf eksopolisakkarit üretimi ile ilişkilendirildi⁶⁷.

Klebsiella spp suşlarından siyah pigment oluşturan, koyu renk mukoid koloniler biyofilm pozitif kabul edilirken, kristal morfoloji gözlenmeden kolonilerin koyulaşması belirsiz sonuç olarak yorumlandı.⁴²

3.6.3. Tüp metodu (TM)

Christensen ve arkadaşları⁶⁸ tarafından Stafilokok suşlarında slime yapının kalitatif değerlendirilmesi için geliştirilen tüp metodu günümüzde halen hızlı sonuç vermesi nedeniyle tercih edilmektedir.^{42, 66, 67} Tüp yönteminde kanlı agarda tek koloni olarak elde edilen suşlar %1 glukoz içeren 5 ml triptik soy broth içerisine inoküle edilerek 24 saat 35 °C' de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından tüpler nazikçe boşaltılarak fosfat tamponlu salin (PBS, pH:7.3) ile yıkandı. Yıkamanın ardından tüpler ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. Kuruyan tüpler %0,1 kristal viyole ile 10 dakika boyamanın ardından deiyonize su ile yıkandı. Tüpler ters çevrilerek kurumaya bırakıldı.

Kuruyan tüpler çıplak gözle tüp çeperinde ve tabanında gözle görülür renk değişikliği açısından değerlendirildi. Besiyerinin sınır hattında yüzük şeklinde renk değişimleri değerlendirmeye alınmadı. Renk değişiminin varlığına ve derecesine göre suşlar biyofilm üreticisi olarak tanımlandı ve derecelendirildi. Biyofilm yapımı "1: negatif, 2: zayıf pozitif, 3: orta pozitif, 4: güçlü pozitif" olarak skorlandı. Test her suş için üç kez tekrarlandı.



Resim 5. Biyofilm Üretiminin Tüp Yöntemi ile Değerlendirilmesi

3.6.4. Doku kültür plak metodu (DKPM)

1985'te Christensen ve arkadaşları tarafından⁶⁸ geliştirilen doku kültür plak metodu biyofilm varlığını kantitatif olarak gösterebilmesi ve medikal ekipmanın test için çıkarılmasının gerekmemesi nedeniyle pek çok çalışmada referans test olarak uygulanmıştır.^{42 66 6 7} . . Çalışmamızda suşların biyofilm yapma kapasitesinin değerlendirilmesinde referans test olarak uygulandı.

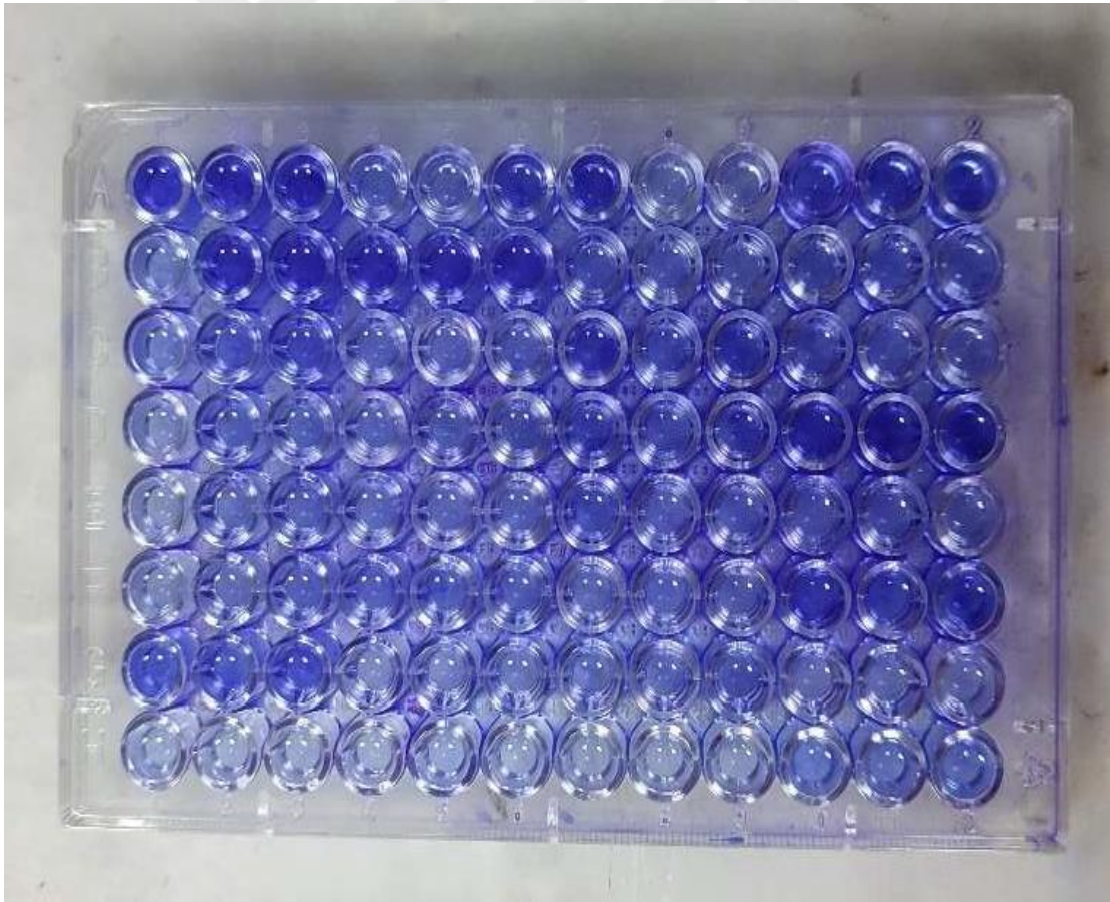
3.6.4.1. 96'lz mikroparka kuyucuklarında biyofilm oluşumunun indüksiyonu

- i. Kanlı agarda çoğaltılarak elde edilen tek kolonilerden her biri %1 glukoz içeren 5 ml triptik soy broth içerisine inoküle edildi.
- ii.ii. 35 °C' de 18-24 saat inkübasyonun ardından taze sıvı besiyeri kullanılarak 1/100 oranında dilüe edildi.

- iii. Dilüe edilen bakteri süspansiyonundan otomatik pipet yardımı ile 0,2 ml alınarak mikropılaka kuyucuğuna ekildi. Her suş için 3 kuyucuğaya ekim yapıldı.
- iv. İnokulumlar 24 saat 35 °C'de inkübe edildi.

3.6.4.2. Oluşturulan biyofilm yapısının boyanması

- v. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı nazikçe uzaklaştırıldı.
- vi. Her kuyucuk 0.2 ml PBS (pH:7.3) ile 3 kez yıkandı.
- vii. Metanol ile fikse edilen kuyucuklar oda ısısında 0.2 ml %0,1 kristal viyole çözeltisi ile 15 dk boyandı.
- viii. Kuyucuklardaki boya nazikçe uzaklaştırıldı.
- ix. Her kuyucuk 2 kez deiyonize su ile yıkandı.



Resim 6. 96'lı Mikropılakalarda Oluşumu İndüklenen Biyofilm Yapısının Boyanması

3.6.4.3. Oluşturulan biyofilm yapısının spektrofotometre ile ölçümü

- x. Bakteri inokülasyonu yapılan kuyucuklar %33' lük 0.2 ml glacial asetik asit ile fikse edildi.
- x1. Thermo Fisher ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.
- x11. Test her suş için 3 kez tekrarlanarak ölçüm değerlerinin ortalaması kaydedildi (OD)
- xm. Optik dansite cut off (ODc) değeri negatif kontrol kuyucuğunun ortalama değerinin 3 standart sapması ile toplamı olarak tanımlandı.⁶⁹
- xiv. Her kuyucuğun optik dansite ölçüm ortalaması (OD) Stepanovic ve arkadaşlarının 2007' de testin değerlendirilmesi için belirlediği standartlara uygun olarak ODc değeri ile kıyaslamalı olarak değerlendirildi.⁶⁹
- xv. Pozitif kontrol suşu ile testin kalite kontrolü yapıldı.
- xvi. Biyofilm üretim kapasitesi negatif, zayıf, orta ve güçlü olarak derecelendirildi.

Main

Processing

Results

Settings

Raw data

Protocol: Demo1 20.05.2035 09:42:30

A1: UN1

Filter 1: 570nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.585	2.939	1.671	0.326	0.311	0.776	1.669	0.258	0.257	0.564	0.918	0.834
B	0.432	1.500	2.250	1.394	1.906	1.337	0.364	0.336	0.291	0.398	0.429	0.486
C	0.688	0.873	0.884	0.305	0.277	0.301	0.971	0.411	0.714	0.341	0.332	0.264
D	0.277	0.558	0.320	0.304	0.281	0.351	0.560	0.365	0.470	1.604	1.566	1.864
E	0.242	0.493	0.349	0.309	0.286	0.279	0.530	0.296	0.316	0.283	0.314	0.268
F	0.265	0.301	0.419	0.487	0.394	0.381	0.268	0.350	0.316	1.055	0.719	1.076
G	0.811	0.770	0.912	0.172	0.263	0.284	0.318	0.358	0.472	0.246	0.248	0.254
H	0.366	0.238	0.239	0.185	0.325	0.201	0.218	0.272	0.267	0.592	0.503	0.614

◀▶:Move

OK:Edit

Close

Menu

Resim 7. 96' lı Mikroplakalarda Oluşturulan Biyofilm Yapısının Spektrofotometre ile Ölçümü

Tablo 2. OD Değerinin OD_c ile Karşılaştırılarak Biyofilm Üretim Derecesinin Belirlenmesi ⁶⁹

OD _c üç negatif kontrol kuyucuğunun OD ortalaması+ (3 x Standart deviasyon)		
		OD < OD _c
		OD _c < OD :S 2 x OD _c
		2 x OD _c < OD :S 4 x OD _c
		4xOD _c < OD
OD: Test edilen süşun 3 kuyucuk optik dansite ortalaması OD _c : OD cut off		

3.7. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilerek en, istatistiksel analizler için IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı.

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) kullanıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk testi, Çarpıklık-Basıklık testi ve grafiksel değerlendirmeler ile sınanmıştır.

Normal dağılım gösteren nicel verilerin iki grup karşılaştırmalarında bağımsız gruplarda t Test, normal dağılım göstermeyen verilerin iki grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı.

Nitel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Chi-Square testi, Fisher Freeman Halton Exact testi ve Fisher's Exact test kullanıldı.

Yöntemler sonuçları arasındaki uyumların değerlendirilmesinde McNemar testi ve Marginal Homogeneity testi kullanıldı. Anlamlılık en az p<0,05 düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler

Ekim 2019 – Haziran 2021 tarihleri arasında DEÜTF Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen trakeal sekresyon örneklerinden *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* izole edilen ve üreyen mikroorganizma sayısı en az 10^5 CFU/ml olan ve klinik bilgileri, konsültasyon notları, diğer test sonuçları, verilen tedaviler incelenerek VİP tanısı konulan hastalardan 112 örnek toplandı.

Çalışma başlangıcına kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan suşlar canlandırıldıktan sonra MALDI-TOF yöntemi ile tanımlandı. Altı örnek üreme olmaması nedeniyle, sekiz örnek kontaminasyon olması nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Toplam 98 örnek çalışmaya alındı. Alınan 98 izolatin 67'si *Acinetobacter spp* (66 *A. baumannii*, 1 *A. pittii*), 31'i *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlandı.

An timikrobiyal duyarlılık testleri kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC25922 ve biyofilm testleri kontrol suşu olarak *K. pneumoniae* ATCC700603 kullanıldı.

4.2. Çalışmaya Dahil Edilen Hastalar

4.2.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet ve KPES bilgileri

Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması $67,5 \pm 16,1$ (18-98) bulundu. *Acinetobacter spp* izole edilen 67 hastanın yaş ortalaması $67,2 \pm 16,1$ (18 -98), *Klebsiella spp* izole edilen 31 hastanın yaş ortalaması $68,1 \pm 16,4$ (26-87) bulundu. Tüm hastaların 61'i (%62,2), *Acinetobacter spp* izole edilen hastaların 41'i (%61,2), *Klebsiella spp* izole edilen hastaların ise 20'si (%64,4'ü) erkekti. *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* grupları arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

VİP tarama yöntemi olarak kullanılan KPES çalışmaya dahil edilen tüm hastalarda altı ve üzerindeydi. Tüm hastaların KPES $7,7 \pm 1,0$, *Acinetobacter spp* izole edilen hastalarda $7,57 \pm 1,0$, *Klebsiella spp* izole edilen hastalarda ise $8 \pm 1,0$ hesaplandı. *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* grupları arasında KPES açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 3. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Yaş, Cinsiyet ve KPES Bilgileri

Değişkenler	Toplam n=98	<i>Acinetobacter spp.</i> , n=67	<i>Klebsiella spp.</i> , n=31	p
Yaş, yıl; <i>Ort</i> ± <i>SS</i>	67,48±16,11			
Cinsiyet, Erkek; <i>n (%)</i>	61 (%62,2)	41 (%61,2)	20 (%64,5)	^b 0,752
KPES skoru; <i>Ort</i> ± <i>SS (Medyan)</i>	7,70±1,05 (7)	7,57±1,05 (8)	8,00±1,00 (8)	^c 0,061

^aIndependent Samples t Test

^bPearson Chi-Square Test

^cMann Whitney U Test

4.2.2. Çalışmaya dahil edilen hastaların HAI, VİP ve MDR organizma ile enfeksiyon gelişimine etki eden risk faktörleri

Çalışmaya dahil edilen hastalar HAI gelişimine etki eden risk faktörleri, VİP gelişimine etki eden risk faktörleri ve ÇİD o rganizma ile enfeksiyon gelişimine etki eden risk faktörleri açısından değerlendirildi (Bkz. Ek-4). *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* grupları arasında değerlendirilen risk faktörleri açısından anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,005$).

Çok ilaca dirençli mikroorganizma ile enfeksiyon gelişimi risk faktörleri arasında bulunan son 90 gün içerisinde antibiyotik kullanım öyküsü hastaların tamamında (%100) mevcuttu.

Tablo 4. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların HAI, VİP ve ÇİD Mikroorganizma ile Enfeksiyon Gelişimine Etki Eden Risk Faktörleri

Değişkenler	Tüm örnekler, n=98	<i>Acinetobacter spp.</i> , n=67	<i>Klebsiella spp.</i> , n=31	p değeri
	n (%)	n (%)	n (%)	
İmmüsupresyon	26 (%26,5)	14 (%20,9)	12 (%38,7)	b0,063
Cerrahi Öyküsü	31 (%31,6)	22 (%32,8)	9 (%29,0)	b0,707
Travma Öyküsü	7 (%7,1)	7 (%10,4)	0 (%0)	e0,094
Reentübasyon	27 (%27,6)	18 (%26,9)	9 (%29,0)	b0,823
Son 90 Gün İçerisinde Antibiyotik Kullanım Öyküsü	98 (%100)	67 (%100)	31 (%100)	-
VİP Sırasında Septik Şok	46 (%46,9)	28 (%41,8)	18 (%58,1)	b0,133
VİP sırasında HD ihtiyacı	22 (%22,4)	12 (%17,9)	10 (%32,3)	b0,113
VİP sırasında ARDS	40 (%40,8)	27 (%40,3)	13 (%41,9)	b0,878
MDR organizma ile kolonizasyon	96 (%98)	66 (%98,5)	30 (%96,8)	d0,536

bPearson Chi-Square Test

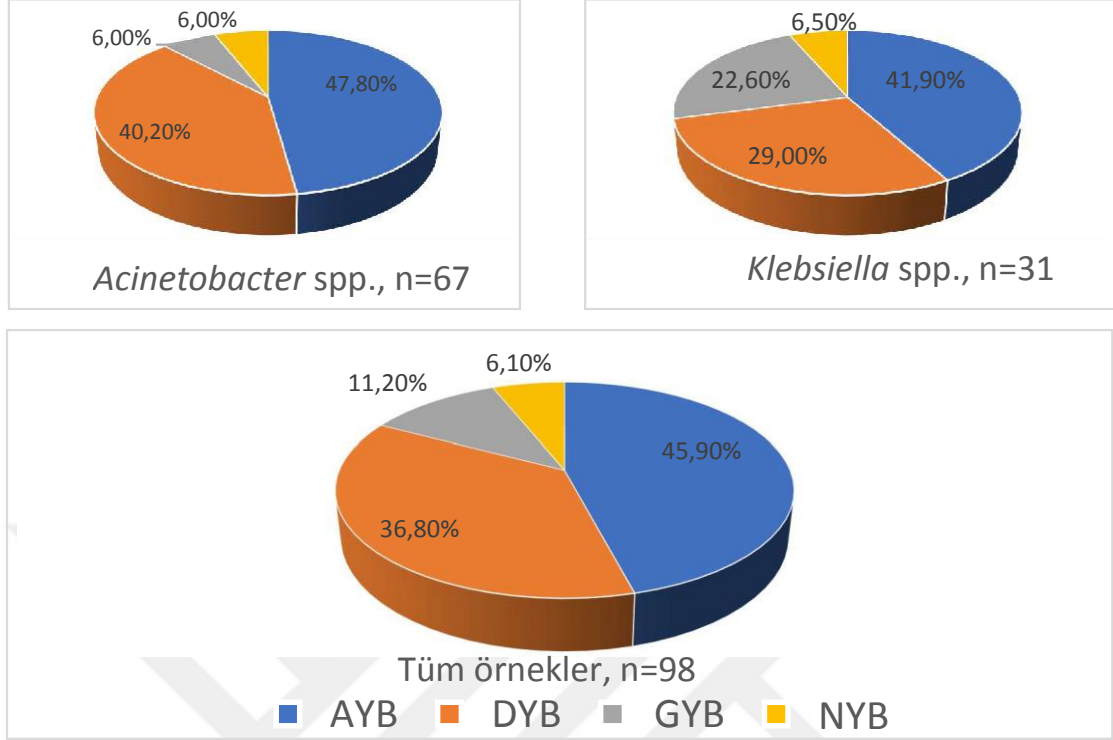
dFisher Freeman Halton Exact Test

eFisher' s Exact Test

4.2.3. Çalışmaya dahil edilen hastaların yoğun bakım ünitelerine dağılımı

Çalışmaya alınan 98 hastanın 45' i (%45,9) Anestezi Yoğun Bakım' da, 36' sı (%36,7) Dahiliye Yoğun Bakım'da, 11'i (%11,2) Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım' da, 6'sı ise (%6,1) ise Nöroloji Yoğun Bakım'da tedavi görmekteydi. *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* grupları arasında hastaların yoğun bakım dağılımı açısından anlamlı fark saptanmadı (Fisher Freeman Halton Exact Test, p=0,113, p>0,05).

Şekil 3. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Yoğun Bakım Ünitelerine Dağılımı



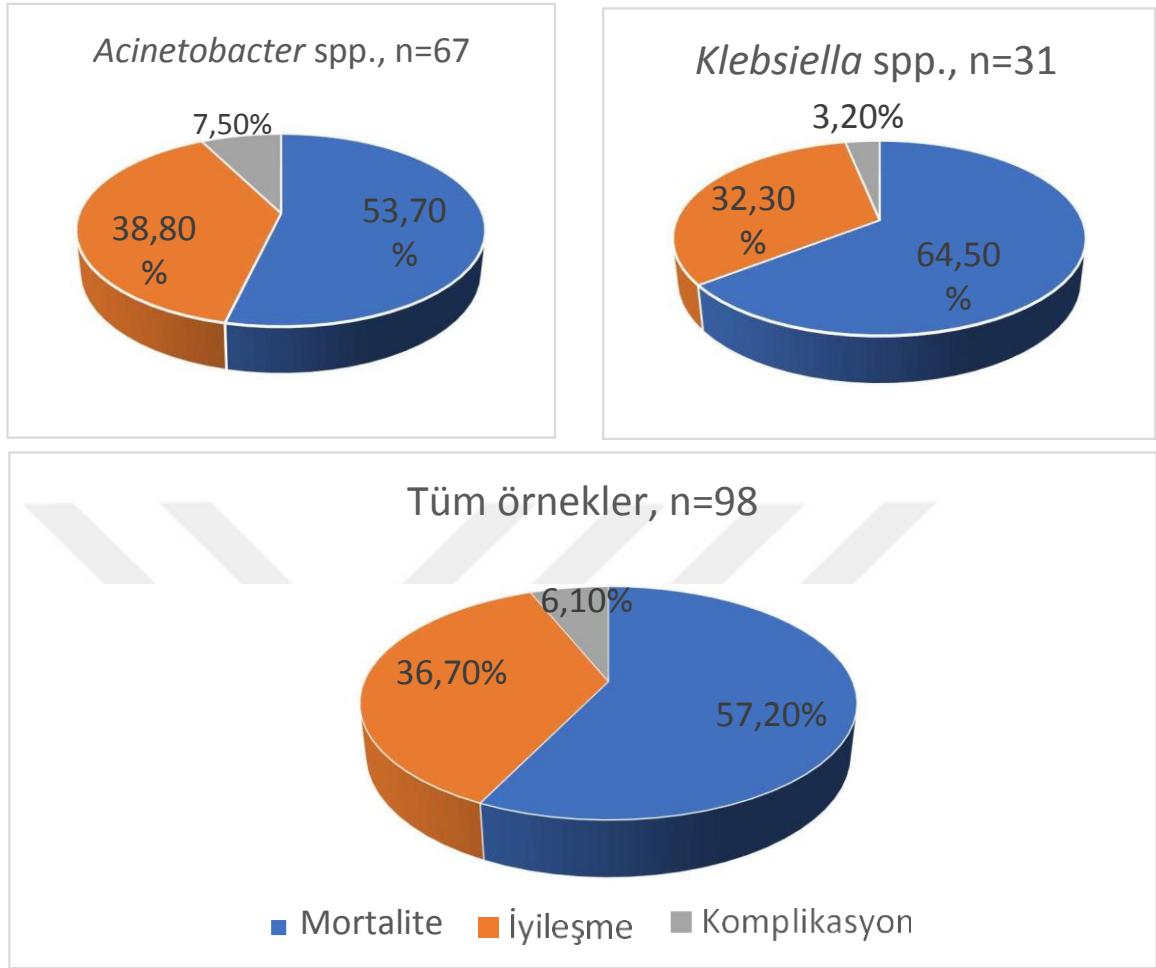
AYB:Anestezi Yoğun Bakım, DYB:Dahiliye Yoğun Bakım, GYB: Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım, NYB: Nöroloji Yoğun Bakım

4.2.4. Hastaların VİP epizodu ve 30 günlük izlem sonuçları

Çalışmaya alınan 98 hastanın 56'sı (%57,2) VİP epizodu sırasında kaybedildi. 36 hastanın (%36,7) epizodu sırasında herhangi komplikasyon yaşanmazken 6 hastada (%6,1) komplikasyon (3 hastada bakteriyemi, 2 hastada plevral effüzyon, 1 hastada pnömotoraks) gelişti (Fisher Freeman Halton Exact Test, $p>0,05$).

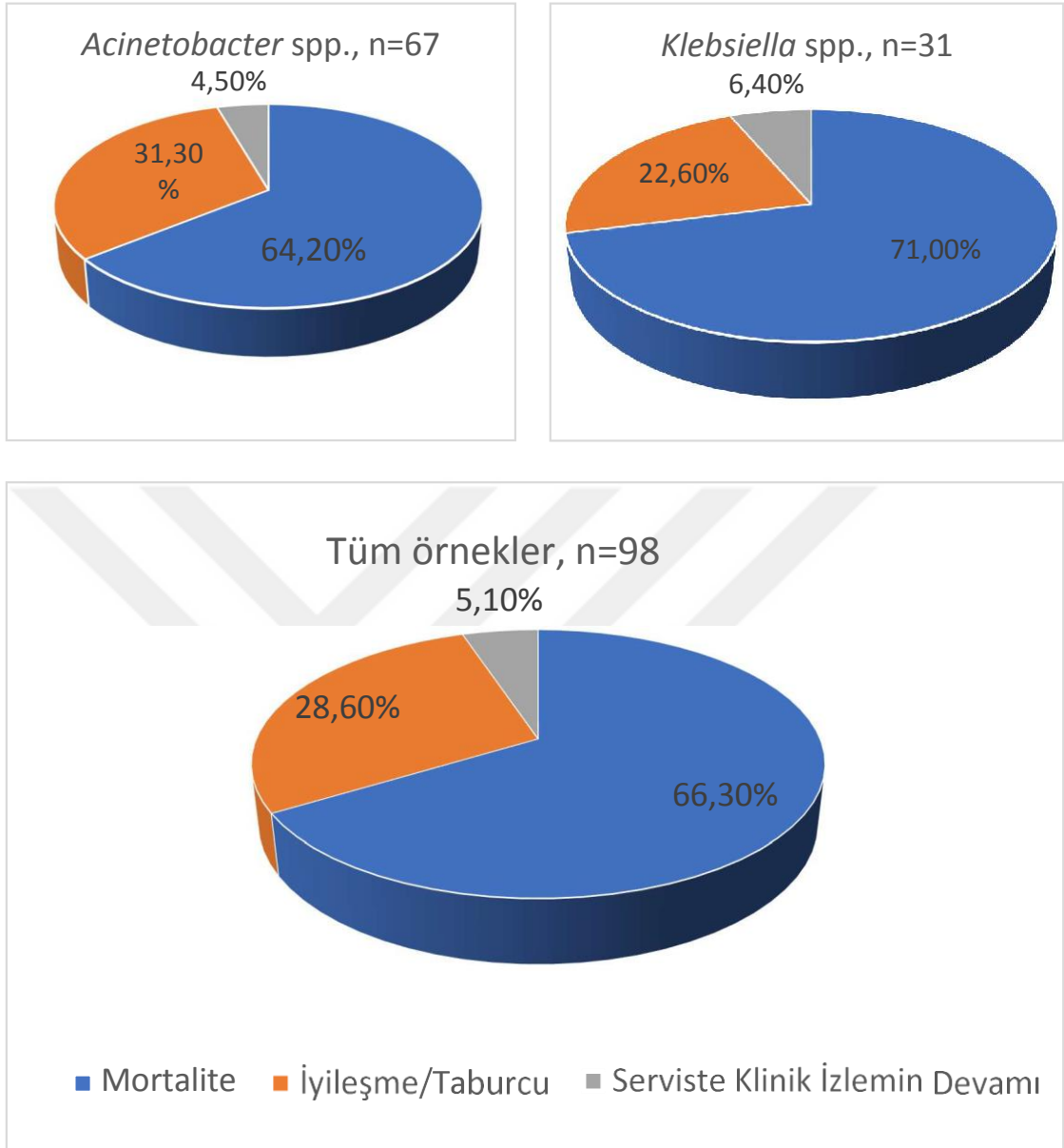
30 günlük izlem sırasında 98 hastanın 65'i (%66,3) kaybedilirken 28 hasta (%28,6) taburcu edildi. 30 günün sonunda 5 hastanın (%5,1) klinik izlemi serviste devam etmekteydi. Her iki grup arasında VİP atağının sonlanımı ve 30 günlük hasta izleniminin sonlanımı açısından anlamlı fark saptanmadı (Fisher Freeman Halton Exact Test, $p>0,05$).

Şekil 4. VİP Epizodu Sonlanımı



*Komplikasyonlar: 3 hastada bakteriyemi, 2 hastada plevral eflüzyon, 1 hastada pnömotoraks

Şekil 5. 30 Günlük Hasta İzlemi Sonlanımı



4.3. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

4.3.1. E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılık sonuçları



Resim 8. E-Test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi

Çalışmaya dahil edilen tilin suşların 84' ü (%85,7) amikasin, 92'si (%93,6) meropenem, 95'i ise (%96,9) seftazidime dirençli bulundu. *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* grupları arasında E-test yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Amikasin ($p=0,001$; $p<0,05$), meropenem ($p=0,011$; $p<0,05$) ve seftazidime ($p=0,030$; $p<0,05$) direnç oranı *Acinetobacter spp* grubunda *Klebsiella spp* grubundan daha yüksek bulundu.

Tablo 5. E-test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

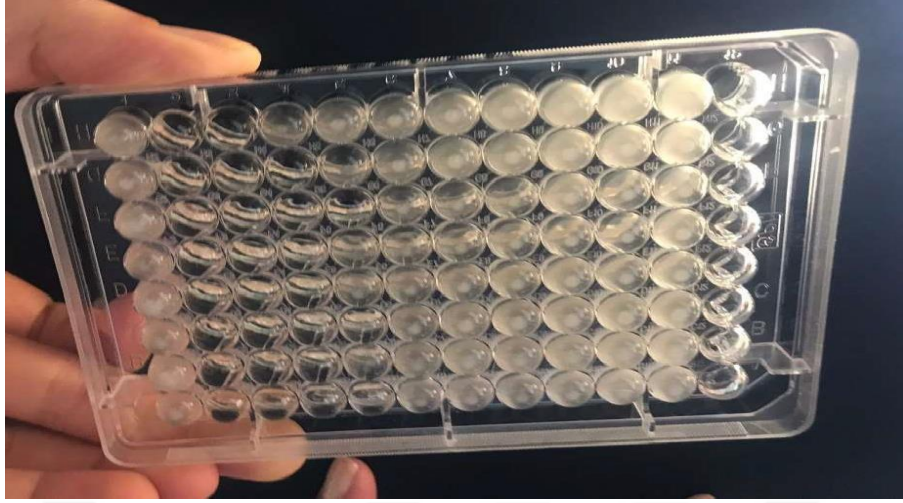
Değişkenler	Tüm örnekler, n=98	<i>Acinetobacter spp.</i> , n=67	<i>Klebsiella spp.</i> , n=31	p değeri
	n(%)	n(%)	n(%)	* $p<0,05$
Amikasin (98)	84 (%85,7)	64 (%95,5)	20 (%64,5)	$eo,001^*$
Meropenem (98)	92 (%93,9)	66 (%98,5)	26 (%83,9)	$cto,011^*$
Seftazidim (98)	95 (%96,9)	67 (%100)	28 (%90,3)	$eo,030^*$

^bPearson Chi-Square Test

^dFisher Freeman Halton Exact Test

^eFisher' s Exact Test

4.3.2. Mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık sonuçları



Resim 9. Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi

Tüm örnekler mikrodilüsyon yöntemi ile meropenem , amikasin ve kolistin duyarlılığı açısından test edildi. Örneklerin 88' i (%89,8) amikasına, 95' i (%96,9) meropeneme ve 25' i (%25,5) kolistine dirençli bulundu. *Acinetobacter spp* ve *Klebsiella spp* grupları arasında amikasına ($p=0,001$; $p<0,05$) ve meropeneme ($p=0,030$; $p<0,05$) direnç açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. *Acinetobacter spp* suşlarında meropeneme ve amikasına direnç oranı *Klebsiella spp* grubundan daha yüksek bulundu.

Tablo 6. Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Değişkenler	Tüm örnekler, n=98	<i>Acinetobacter</i> spp., n=67	<i>Klebsiella</i> spp., n=31	p değeri
	n (%)	n(%)		
Amikasin (98)	88 (%89,8)	65		0,001
	(%97)	23 (%74,2)		
Kolistin (98)	25 (%25,5)	16 (%23,9)	9 (%29,0)	0,623
Meropenem (98)	95 (%96,9)	67 (%100)	28 (%90,3)	0,030
Seftazidim (31)			29 (%93,5)	
Fosfomisin (31)			31 (%100)	

^bPearson Chi-Square Test

^dFisher Freeman Halton Exact Test

^eFisher' s Exact Test

4.4. E-Test ve Mikrodilüsyon Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

4.4.1. *Klebsiella* spp grubunda antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Klebsiella spp grubunda E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri arasında seftazidim, meropenem ve amikasin duyarlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=1,000$, $p=1,000$, $p=508$; $p>0,005$).

Tablo 7. *Klebsiella* spp Grubunda Seftazidim Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Seftazidim <i>Klebsiella</i> spp n=31 P=1,000		E-test		
		Duyarlı	Dirençli	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)
Mikrodilüsyon	Duyarlı	2 (6,5)	0 (0)	2 (6,5)
	Dirençli	1 (3,2)	28 (90,3)	29 (93,5)
	Toplam	3 (9,7)	28 (90,3)	31 (100)

McNemar Test

Tablo 8. *Klebsiella* spp Grubunda Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Meropenem <i>Klebsiella</i> spp n=31 P=1,000		E-test		
		Duyarlı	Dirençli	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)
Mikrodilüsyon	Duyarlı	3 (9,7)	0 (0)	3 (9,7)
	Dirençli	1 (3,2)	27 (87,1)	28 (90,3)
	Toplam	4 (12,9)	27 (87,1)	31 (100)

McNemar Test

Tablo 9. *Klebsiella* spp Grubunda Amikasin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Amikasin <i>Klebsiella</i> spp n=31 P=0,508		E-test		
		Duyarlı	Dirençli	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)
Mikrodilüsyon	Duyarlı	5 (16,1)	3 (9,7)	8 (25,8)
	Dirençli	6 (19,4)	17 (54,8)	23 (74,2)
	Toplam	11 (35,5)	20 (64,5)	31 (100)

McNemar Test

4.4.2. *Acinetobacter* spp grubunda antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Acinetobacter spp mikrodilüsyon yöntemi ile tüm suşlar meropeneme dirençli bulunduğundan e-test yöntemi ile mikrodilüsyon testi arasında meropenem duyarlılığı açısından istatistiksel ilişki değerlendirilemedi. *Acinetobacter* spp grubunda E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri arasında amikasin duyarlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p=1,000$, $p>0,005$).

Tablo 10. *Acinetobacter* spp Grubunda Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Meropenem <i>Acinetobacter</i> spp n=67		E-test		
		Duyarlı	Dirençli	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)
Mikrodilüsyon	Duyarlı	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Dirençli	1 (1,5)	66 (98,5)	67 (100)
	Toplam	1 (1,5)	66 (98,5)	67 (100)

McNemar Test

Tablo 11. *Acinetobacter* spp Grubunda Amikasin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Amikasin <i>Acinetobacter</i> spp n=67 P=1,000		E-test		
		Duyarlı	Dirençli	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)
Mikrodilüsyon	Duyarlı	2 (3)	0 (0)	2 (3)
	Dirençli	1 (1,5)	64 (95,5)	65 (97)
	Toplam	3 (4,5)	64 (95,5)	67 (100)

McNemar Test

4.4.3. Tüm örneklerin antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Tüm örneklerin meropenem ve amikasin duyarlılığı açısından e-test ve mikrodilüsyon yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,500$, $p=0,344$; $p>0,005$).

Tablo 12. Tüm örneklerde Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Meropenem		E-test		
Tüm Örnekler spp n=98		Duyarlı	Dirençli	Toplam
P=0,500		n (%)	n (%)	n (%)
Mikrodilüsyon	Duyarlı	3 (3,1)	0 (0)	3 (3,1)
	Dirençli	2 (2)	93 (94,9)	95 (96,9)
	Toplam	5 (5,1)	93 (94,9)	98 (100)

McNemar Test

Tablo 13. Tüm örneklerde Amikasin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Amikasin		E-test		
Tüm Örnekler spp n=98		Duyarlı	Dirençli	Toplam
P=0,344		n (%)	n (%)	n (%)
Mikrodilüsyon	Duyarlı	7 (7,1)	3 (3,1)	10 (10,2)
	Dirençli	7 (7,1)	81 (82,7)	88 (89,8)
	Toplam	14 (14,2)	84 (85,8)	98 (100)

McNemar Test

4.4.4. E-test yöntemi antibiyotik duyarlılık sonuçlarının mikrodilüyon yöntemi karşılaştırılarak değerlendirilmesi

E-test yönteminin duyarlılık, özgüllük, negatif ve pozitif prediktif değer ve doğruluk değerleri *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp ve tüm hasta grubunda değişkenlik göstermektedir.

Tablo 14. E-Test Yöntemi Antibiyotik Duyarlılık Sonuçlarının Mikrodilüyon Yöntemi Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi

		Duyarlılık %	Özgüllük %	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer	Doğruluk
<i>Klebsiella</i> spp, n=31	Seftazidim	96,5	100	100	66,6	96,7
	Amikasin	73,9	62,5	85	45,5	70,9
	Meropenem	96,4	100	100	75	96,7
<i>Acinetobacter</i> spp, n=67	Amikasin	98,4	100	100	66,6	98,5
	Meropenem	98,5	0	100	0	98,5
Tüm hasta grubu, n=98	Amikasin	92	70	96,4	50	89,7
	Meropenem	97,8	100	100	60	97,9

4.5. Biyofilm Üretiminin Farklı Yöntemlerle Test Edilmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm örneklerin biyofilm üretim kapasitesi string testi, kongo kırmızısı agar yöntemi, tüp metodu ve doku kültür plak metodu ile test edildi. String testi, kongo kırmızısı agar yöntemi ve tüp metodunun tanı değerleri invitro biyofilm araştırmalarında altın standart test olarak kullanılan doku kültür plak yöntemi ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Tablo 15. Tüm Örneklerin Farklı Yöntemlerle Biyofilm Üretimi Test Sonuçları

Sıra No	Örnek No	Tür	ST	KKAY	TM	DKPM
1	1	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
2	2	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
3	3	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
4	4	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
5	5	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
6	6	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
7	7	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
8	8	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
9	9	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
10	10	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
11	11	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
12	12	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
13	13	<i>Klebsiella</i> spp	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif
14	14	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
15	15	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
16	16	<i>Acinetobacter</i> spp	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
17	17	<i>Acinetobacter</i> spp	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
18	18	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif

ST: String Testi, KKA^Y: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi, TM: Tüp Metodu, DKPM: Doku Kültür Plak Metodu

Tablo 15. Tüm Örneklerin Farklı Yöntemlerle Biyofilm Üretimi Test Sonuçları (Devam)

Sıra No	Örnek No	Tür	ST	KKAY	TM	DKPM
19	20	<i>Acinetobacterspp</i>	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
20	21	<i>Acinetobacterspp</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
21	23	<i>Acinetobacter spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
22	24	<i>Acinetobacter spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
23	26	<i>Acinetobacter spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
24	27	<i>Klebsiella spp</i>	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
25	28	<i>Klebsiella^{spp}</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
26	29	<i>Acinetobacter^{spp}</i>	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
27	30	<i>Klebsiella^{spp}</i>	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
28	31	<i>Klebsiella^{spp}</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
29	32	<i>Klebsiella^{spp}</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
30	33	<i>Klebsiella^{spp}</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
31	35	<i>Klebsiella spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
32	36	<i>Klebsiella spp</i>	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
33	37	<i>Acinetobacter spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
34	38	<i>Acinetobacter^{spp}</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
35	39	<i>Klebsiella^{spp}</i>	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
36	40	<i>Acinetobacter^{spp}</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
37	42	<i>Acinetobacter spp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif

ST: String Testi, KKAY: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi, TM: Tüp Metodu, DKPM: Doku Kültür Plak Metodu

Tablo 15. Tüm Örneklerin Farklı Yöntemlerle Biyofilm Üretimi Test Sonuçları (Devam)

Sıra No	Örnek No	Tür	ST	KKAY	TM	DKPM
38	43	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
39	45	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
40	46	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
41	47	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
42	48	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
43	51	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
44	52	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
45	53	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
46	55	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
47	56	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
48	57	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
49	58	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
50	59	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
51	61	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
52	62	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
53	63	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
54	64	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
55	65	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
56	66	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif

ST: String Testi, KKAY: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi, TM: Tüp Metodu, DKPM: Doku Kültür Plak Metodu

Tablo 15. Tüm Örneklerin Farklı Yöntemlerle Biyofilm Üretimi Test Sonuçları (Devam)

Sıra No	Örnek No	Tür	ST	KKAY	TM	DKPM
57	68	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
58	69	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
59	70	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
60	71	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
61	72	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
62	73	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
63	74	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
64	75	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
65	76	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
66	77	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
67	78	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
68	81	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
69	82	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
70	83	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
71	84	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
72	85	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
73	86	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
74	87	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
75	88	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif

ST: String Testi, KKAY: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi, TM: Tüp Metodu, DKPM: Doku Kültür Plak Metodu

Tablo 15. Tüm Örneklerin Farklı Yöntemlerle Biyofilm Üretimi Test Sonuçları (Devam)

Sıra No	Örnek No	Tür	ST	KKAY	TM	DKPM
76	89	<i>Acinetobacterspp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
77	90	<i>Acinetobacterspp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
78	91	<i>Acinetobacterspp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
79	92	<i>Acinetobacterspp</i>	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
80	93	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
81	94	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
82	95	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
83	96	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
84	97	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
85	98	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
86	99	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
87	100	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
88	101	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
89	102	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
90	103	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
91	104	<i>Acinetobacter</i> spp	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif
92	105	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
93	106	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
94	107	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif

ST: String Testi, KKAY: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi, TM: Tüp Metodu, DKPM: Doku Kültür Plak Metodu

Tablo 15. Tüm Örneklerin Farklı Yöntemlerle Biyofilm Üretimi Test Sonuçları (Devam)

Sıra No	Örnek No	Tür	ST	KKAY	TM	DKPM
95	108	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
96	109	<i>Klebsiella</i> spp	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
97	110	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
98	112	<i>Acinetobacter</i> spp	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif

ST: String Testi, KKAY: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi, TM: Tüp Metodu, DKPM: Doku Kültür Plak Metodu

4.5.1. Doku kültür plak metodu ile biyofilm üretiminin test edilmesi

Biyofilm üretiminin araştırılmasında altın standart test olarak kullanılan doku kültür plak yöntemi ile tüm suşların 87'sinde (%88,8) biyofilm üretimi saptandı. *Acinetobacter* spp grubunda 56 örnekte (%83,6), *Klebsiella* spp grubunda ise örneklerin tamamında (31 örnek) biyofilm üretimi saptandı. *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp grupları arasında *Klebsiella* spp grubunda biyofilm üretimi anlamlı olarak daha sık saptandı (^aFisher's Exact Test, ^bPearson Chi-Square Test, $p=0,015$; $p<0,05$).

4.5.2. Tüp metodu ile biyofilm üretiminin test edilmesi

Tüp yöntemiyle tüm örneklerin 84'ü (%85,7) biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi. *Acinetobacter* spp suşları arasından 60'ı (%89,6), *Klebsiella* spp suşları arasında 24'ü (%77,4) biyofilm pozitif olarak sonuçlandı. *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp grupları arasında tüp metodu ile biyofilm üretiminin analizi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

4.5.3. Kongo kırmızısı agar yöntemi ile biyofilm üretiminin test edilmesi

Kongo kırmızısı agar yönteminde tüm örneklerin 21'i (%21,4) biyofilm pozitif bulundu. 67 *Acinetobacter spp* izolatından 4'ü (%6), 31 *Klebsiella spp* izolatının ise 17'si (%54,8) biyofilm üreticisi olarak saptandı. Kongo agar yöntemine göre *Klebsiella* suşlarında biyofilm üretimi anlamlı olarak daha sık saptandı ($p<0,05$).

4.5.4. String yöntemi ile biyofilm üretiminin test edilmesi

String testinde tüm suşların 6'sı (%6,1) biyofilm pozitif, 92'si ise biyofilm negatif bulundu. *Acinetobacter spp* suşları arasında 5 örnek (%7,5) biyofilm pozitif iken *Klebsiella spp* suşları arasında 1 örnek (%3,2) biyofilm pozitif olarak değerlendirildi. İki grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 8. Farklı Yöntemlerle Etkenlere Göre Biyofilm Üretim Oranlarının Saptaması

Değişkenler	ST ($p=0,661$)	KKAY (* $p=0,001$)	TM ($p=0,128$)	DKPM (* $p=0,015$)
Tüm örnekler, n=98, n (%)	6 (%6,1)	21 (%21,4)	84 (%85,7)	87 (%88,8)
<i>Acinetobacter spp.</i> n=67, n (%)	5 (%7,5)	4 (%6)	60 (%89,6)	56 (%83,6)
<i>Klebsiella spp.</i> , n=31, n (%)	1 (%3,2)	17 (%54,8)	24 (%77,4)	31 (%100)

ST: String Testi, KKAY: Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi, TM: Tüp Metodu, DKPM: Doku Kültür Plak Metodu

4.6. Biyofilm Üretiminin Derecelendirilmesi

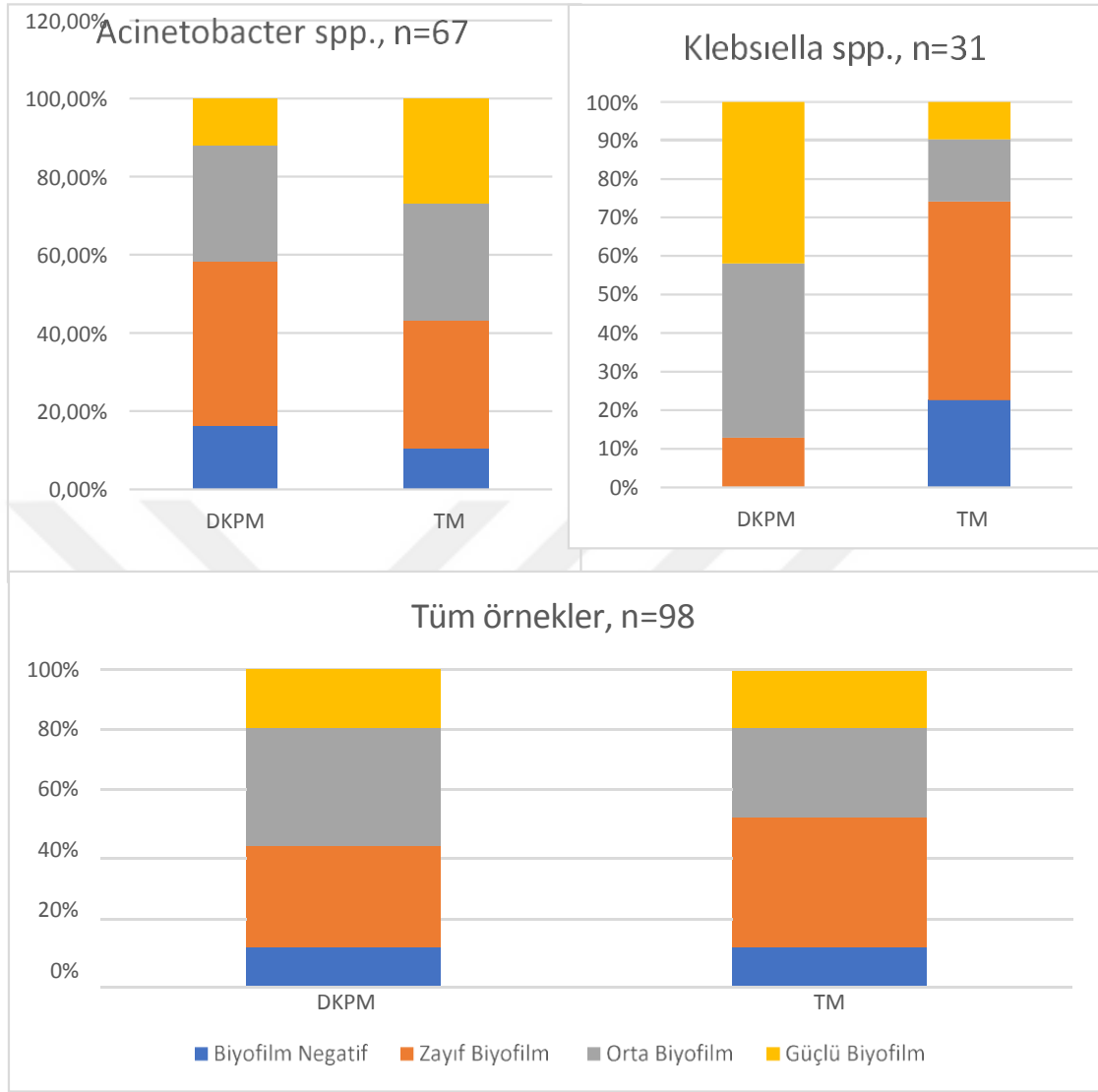
Tüp yöntemiyle tüm örneklerin 21'i (%21,4) güçlü biyofilm üreticisi, 25'i (%25,5) orta derece biyofilm üreticisi, 38'i ise (%38,8) zayıf biyofilm üreticisi olarak tespit edildi. 14 örnekte (%14,3) biyofilm üretimi saptanmadı. *Acinetobacter* spp grubunda örneklerin 18'inin (%26,9) güçlü, 20'sinin (%29,9) orta derece, 22'sinin ise (%32,8) zayıf biyofilm üretimi yaptığı tespit edildi. 7 örnekte (%10,4) biyofilm üretimi gözlenmedi. *Klebsiella* spp grubunda ise örneklerin 3'ü (%9,7) güçlü, 5'i (%16,1) orta derece, 6'sı ise (%51,6) zayıf biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi. 7 örnekte (%22,6) biyofilm üretimi gözlenmedi.

Tüp yöntemi ile biyofilm üretim derecesi değerlendirildiğinde *Klebsiella* spp suşlarının zayıf biyofilm üretimi yapma eğiliminde, *Acinetobacter* spp suşlarının ise orta derece ve güçlü biyofilm üretimi yapma eğiliminde olduğu görüldü ($p<0,05$).

Doku kültür plak metoduyla tüm suşların 21'inde (%21,4) güçlü biyofilm üretimi saptanırken 34'ünde (%34,7) orta derece, 32'sinde (%32,7) ise zayıf biyofilm üretimi mevcuttu. *Acinetobacter* suşlarından 8'i (%11,9) güçlü, 11 örnekte (%11,2) biyofilm üretimi saptanmadı. 20'si (%29,9) orta derece, 28'i ise (%41,8) zayıf biyofilm üretimi yaparken 11 örnekte (%16,4) biyofilm üretimi saptanmadı. *Klebsiella* suşlarından 13'ünde (%41,9) güçlü, 14'ünde (%45,2) orta derece, 4'ünde ise (%12,9) zayıf biyofilm üretimi tespit edildi.

Doku kültür plak metodu ile biyofilm üretim derecesi değerlendirildiğinde *Acinetobacter* spp grubunda negatif ve zayıf biyofilm oranı, *Klebsiella* spp grubunda ise orta ve güçlü biyofilm görülme oranı anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,001$; $p<0,05$).

Şekil 6. Biyofilm Üretiminin Doku Kültür Plak Metodu ve Tüp Metodu ile Derecelendirilmesi



DKPM: Doku Kültür Plak Metodu, TM: Tüp Metodu

4.7. Biyofilm Üretimi Analiz Testlerinin Değerlendirilmesi

String testi, kongo kırmızısı agar yöntemi ve tüp metodu ile elde edilen sonuçlar biyofilm üretiminin araştırılmasında altın standart test olarak kullanılan doku kültür plak yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak testlerin tanısal değerleri belirlendi.

4.7.1. Tüp metodunun değerlendirilmesi

Tüp metodu sonuçları ile doku kültür plak metodu sonuçları arasında uyum görülmektedir ($p=0,690$; $p>0,05$). Doku kültür plak metoduna göre olguların %11,2' sinin ($n=11$) sonucu negatif, %88,8' inin ($n=87$) ise pozitifdir; tüp yöntemine göre ise %14,3' ünün ($n=14$) sonucu negatif, %85,7' sinin ($n=84$) pozitifdir.

Doku kültür plak metoduna göre olguların 11' inin sonucu negatif iken, tüp yönteminde bu olguların tümünün sonucu pozitif saptanmıştır. Plaka yönteminde olguların 87'sinin sonucu pozitif iken, tüp yönteminde bu olguların yalnız 73' ü pozitif, 14'ü negatif bulunmuştur.

Tablo 16. Tüp Metodu Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Tüm Örnekler)

Tüm Örnekler N=98 p=0,690		Tüp yöntemi		
		Biyofilm Negatif	Biyofilm Pozitif	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)
Doku	Biyofilm Negatif	0 (0)	11 (11,2)	11 (11,2)
Kültür Plak	Biyofilm Pozitif	14 (14,3)	73 (74,5)	87 (88,8)
Metodu	Toplam	14 (14,3)	84 (85,7)	98 (100)

McNemar Test

***Acinetobacter spp* için** İki yöntem arasında uyum görülmektedir ($p=0,481$; $p>0,05$).

Doku kültür plak metoduna göre negatif sonuçlanan 11 örneğin tümü tüp metodu ile pozitif saptanmıştır. Doku kültür plak metodunda örneklerin 56'sının sonucu pozitif iken, tüp yönteminde bu olguların yalnız 49' u pozitif saptanmıştır.

***Klebsiella spp* için** doku kültür plak metodu ile örneklerin tamamı ($n=31$) pozitif saptanmıştır. Tüp yönteminde ise bu olguların yalnız 24' ü pozitif saptanırken, 7'si negatif olarak saptanmıştır.

Doku kültür plak metodu sonuçları ile değerlendirildiğinde tüp testinin duyarlılığı %83,91; özgüllüğü %0; pozitif kestirim değeri %86,9; negatif kestirim değeri %0 ve doğruluğu %74,49 olarak hesaplandı.

Tablo 17. Tüp Metodu Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Gruplar Arasında)

P=0,481		Tüp Metodu				
Tür		<i>Acinetobacter spp</i> , n (%)			<i>Klebsiella spp</i> , n (%)	
Doku Kültür		Biyofilm	Biyofilm	Toplam	Biyofilm	Biyofilm
Plak Metodu		Negatif	Pozitif		Negatif	Pozitif
Biyofilm		0 (0)	11 (16,4)	11 (16,4)	0 (0)	0 (0)
Negatif						
Biyofilm		7 (10,4)	49 (73,1)	56 (83,6)	7 (22,6)	24 (77,4)
Pozitif						
Toplam		7 (10,4)	60 (89,6)	67 (100)	7 (22,6)	24 (77,4)

McNemar Test

4.7.2. Kongo Kırmızısı Agar Yönteminin Değerlendirilmesi

Kongo kırmızısı agar yöntemi sonuçları ile doku kültür plak metodu sonuçları incelendiğinde; iki yöntem arasında uyum görülmemektedir ($p=0,001$; $p<0,05$). Doku kültür plak metoduna göre olguların %11,2'sinin ($n=11$) sonucu negatif, %88,8'inin ($n=87$) ise pozitifdir. Kongo kırmızısı agar yöntemine göre ise %78,6'sının ($n=77$) sonucu negatif, %21,4'ünün ($n=21$) pozitifdir.

Doku kültür plak metoduna göre olguların 11'inin sonucu negatif iken, Kongo kırmızısı agar yönteminde bu olguların 10'unun sonucunu yine negatif saptanmış ve 1 olgunun sonucu ise pozitif olarak belirlenmiştir. Doku kültür plak metodunda olguların 87'sinin sonucu pozitif saptanırken Kongo kırmızısı agar yönteminde bu olguların yalnız 20'si pozitif sonuçlanmıştır.

***Acinetobacter spp* için** iki yöntem arasında uyum görülmemektedir ($p=0,001$; $p<0,05$). Doku kültür plak metoduna göre örneklerin 11'inin sonucu negatif iken, Kongo kırmızısı agar yönteminde bu olguların 10'unun sonucu yine negatif saptanmıştır. Doku kültür plak metodunda örneklerin 56'sı pozitif sonuçlanırken Kongo kırmızısı agar yönteminde bu örneklerin yalnız 3'ü pozitif saptanmıştır.

***Klebsiella spp* için** doku kültür plak metodunda örneklerin tümü (n=31) pozitif saptanmıştır. Kongo kırmızısı agar yönteminde ise bu örneklerin 17'si pozitif, 14' ü ise negatif saptanmıştır.

Doku kültür plak metodu sonuçları ile değerlendirildiğinde Kongo kırmızısı agar testinin duyarlılığı %22,99; özgüllüğü %90,91; pozitif kestirim değeri %95,24; negatif kestirim değeri %12,99 ve doğruluğu %30,61 olarak hesaplandı.

Tablo 18. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Tüm Örnekler)

Tüm Örnekler N=98 P=0,001		Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi		
		Biyofilm Negatif	Biyofilm Pozitif	Toplam
		n (%)	n (%)	n (%)
Doku Kültür Plak Metodu	Biyofilm Negatif	10 (10,2)	1 (1,0)	11 (11,2)
	Biyofilm Pozitif	67 (68,4)	20 (20,4)	87 (88,8)
	Toplam	77 (78,6)	21 (21,4)	98 (100)

McNemar Test

Tablo 19. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Gruplar Arasında)

P=0,001		Kongo Kırmızısı Agar Metodu				
Tür		<i>Acinetobacter spp</i> , n(%)			<i>Klebsiella spp</i> , n (%)	
		Biyofilm Negatif	Biyofilm Pozitif	Toplam	Biyofilm Negatif	Biyofilm Pozitif
Doku Kültür Plak Metodu						
Biyofilm Negatif		10 (14,9)	1 (1,5)	11 (16,4)	0 (0)	0 (0)
Biyofilm Pozitif		53 (79,1)	3 (4,5)	56 (83,6)	14 (45,2)	17 (54,8)
Toplam		63 (94,0)	4 (6,0)	67 (100)	14 (45,2)	17 (54,8)

McNemar Test

4.7.3. String Testinin Değerlendirilmesi

String testi sonuçları ile doku kültür plak metodu sonuçları incelendiğinde ; iki yöntem arasında uyum görülmemektedir ($p=0,001$; $p<0,05$). Doku kültür plak metodunda örneklerin %11,2'si ($n=11$) negatif, %88,8'i ($n=87$) ise pozitif sonuçlandı. String testi göre ise örneklerin %93,9'unun ($n=92$) sonucu negatif, %6,1'inin ($n=6$) pozitifdir.

Doku kültür plak metodunda negatif sonuçlanan 11 örnekten 10'u string testi ile yine negatif saptanmış ve 1 örneğin sonucu ise pozitif saptanmıştır. Doku kültür plak metodunda pozitif sonuçlanan 87 örnekten yalnız 5'i string testi ile pozitif saptanmıştır.

Tablo 20. String Testi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Tüm Örnekler)

Tüm Örnekler		String Testi		
N=98		Biyofilm	Biyofilm	Toplam
P=0,001		Negatif	Pozitif	
		n (%)	n (%)	n (%)
Plaka yöntemi	Biyofilm Negatif	10 (10,2)	1 (1,0)	11 (11,2)
	Biyofilm Pozitif	82 (83,7)	5 (5,1)	87 (88,8)
	Toplam	92 (93,9)	6 (6,1)	98 (100)

McNemar Test

***Acinetobacter spp* için** iki yöntem arasında uyum görülmemektedir ($p=0,001$; $p<0,05$). Doku kültür plak metoduna göre örneklerin %16,4'ünün ($n=11$) sonucu negatif , %83,6'sının ($n=56$) ise pozitifdir. String testi yöntemine göre ise örneklerin %92,5'inin ($n=62$) sonucu negatif, %5,7'sinin ($n=5$) pozitifdir. Doku kültür plak metodunda negatif sonuçlanan 11 örneğin 10'u string testi ile yine negatif saptanırken, 1'i pozitif saptanmıştır. Doku kültür plak metodunda pozitif sonuçlanan 56 örneğin yalnız 4'ü string testi ile pozitif saptanırken, 52'si negatif bulunmuştur.

***Klebsiella spp* için** doku kültür plak metodu ile örneklerin tamamı (n=31) pozitif saptanmıştır. String testi yönteminde ise bu olguların yalnız 1'i pozitif, 30' u negatif olarak saptanmıştır.

Doku kültür plak metodu sonuçları ile değerlendirildiğinde string testinin duyarlılığı %5,75; özgüllüğü %90,91; pozitif kestirim değeri %83,33; negatif kestirim değeri %10,87 ve doğruluğu %15,31 olarak hesaplandı.

Tablo 21. String Testi Sonuçlarının Doku Kültür Plak Metodu ile Karşılaştırılması (Gruplar Arasında)

P=0,001		String Testi				
Tür	<i>Acinetobacter spp, n(%)</i>			<i>Klebsiella spp, n(%)</i>		
DKPM	Biyofilm	Biyofilm	Toplam	Biyofilm	Biyofilm	Toplam
	Negatif	Pozitif		Negatif	Pozitif	
Biyofilm	10 (14,9)	1 (1,5)	11 (16,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Negatif						
Biyofilm	52 (77,6)	4 (6,0)	56 (83,6)	30 (96,8)	1 (3,2)	31 (100)
Pozitif						
Toplam	62 (92,5)	5 (7,5)	67 (100)	30 (96,8)	1 (3,2)	31 (100)

McNemar Test

String testi , kongo kırmızısı agar yöntemi ve tüp metodu ile elde edilen sonuçlar altın standart test olarak kullanılan doku kültür plak metodu sonuçları ile karşılaştırılarak testlerin tanısal değerleri belirlendi.

String testi, kongo kırmızısı agar yöntemi ve tüp metodu arasında en yüksek duyarlılık ve doğruluk oranları tüp metodunda saptandı. String testi ve kongo kırmızısı agar yönteminde özgüllük yüksek bulunurken (%90,91) duyarlılık ve özgüllük değerleri düşük saptandı. Test sonuçlarında doğruluk oranı en yüksek tüp metoduda gözlenirken ardından sırasıyla kongo kırmızısı agar yöntemi ve en düşük string testinde gözlemlendi.

Tablo 22. Biyofilm Analiz Testlerinin Tanısal Değerleri

Tanımlama Yöntemi	Duyarlılık %	Özgüllük %	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer	Doğruluk
ST	5,75	90,91	83,33	10,87	15,31
KKA	22,99	90,91	95,24	12,99	30,61
TM	83,91	0	86,90	0	74,49

ST: String Testi, KKA: Kongo Kırmızısı Agar Metodu TM: Tüp Metodu

4.7.4. Biyofilm üretim derecelerinin karşılaştırılması

Tüm çalışma grubunun doku kültür plak metodu ve tüp metodu sonuçları incelendiğinde; iki yöntem arasında uyum görülmektedir ($p=0,340$; $p>0,05$). Doku kültür plak metoduna göre tüm örneklerin 11'inin sonucu negatif iken, tüp yönteminde bu örneklerden hiçbiri negatif sonuçlanmamıştır. Doku kültür plak metodunda zayıf biyofilm üretimi saptanan 28 örneğin yalnız 12'sinde tüp metodu ile zayıf biyofilm üretimi tespit edilmiştir. Doku kültür plak metodunda örneklerin 20'sinde orta derece biyofilm üretimi saptanırken tüp yönteminde bu örneklerin yalnız 7'sinde orta derece biyofilm üretimi belirlenmiştir. Doku kültür plak metodunda güçlü biyofilm üretimi yaptığı belirlenen 8 örneğin ise yalnız 3' ü tüp metodu ile güçlü biyofilm üreticisi olarak belirlenmiştir.

***Acinetobacter spp* grubunun** doku kültür plak metodu ve tüp metodu sonuçları incelendiğinde; iki yöntem arasında uyum görülmemektedir ($p=0,014$; $p<0,05$).

***Klebsiella spp* grubunun** doku kültür plak metodu ve tüp metodu sonuçları incelendiğinde; iki yöntem arasında uyum görülmemektedir ($p=0,010$; $p<0,05$).

Tablo 23. Tüm Örneklerin Biyofilm Üretim Derecelerinin Karşılaştırılması

Tüm Örnekler, n=98		Tüp Metodu				
P=0,340		Negatif	Zayıf	Orta	Güçlü	Toplam
DKPM, N(%)	Negatif	0 (0)	5 (5,1)	3 (3,1)	3 (3,1)	11 (11,2)
	Zayıf	9 (9,2)	13 (13,3)	8 (8,2)	2 (2,0)	32 (32,7)
	Orta	4 (4,1)	11 (11,2)	8 (8,2)	11 (11,2)	34 (34,7)
	Güçlü	1 (1,0)	9 (9,2)	6 (6,1)	5 (5,1)	21 (21,4)
	Toplam	14 (14,3)	38 (38,8)	25 (25,5)	21 (21,4)	98 (100)

Marginal Homogeneity Test

Tablo 24. *Acinetobacterspp.* Grubunda Biyofilm Üretim Derecelerinin Karşılaştırılması

Acinetobacter spp, n=67		Tüp Metodu				
P=0,014		Negatif	Zayıf	Orta	Güçlü	Toplam
DKPM, N (%)	Negatif	0 (0)	5 (7,5)	3 (4,5)	3 (4,5)	11 (16,4)
	Zayıf	6 (9)	12 (17,9)	8 (11,9)	2 (3,0)	28 (41,8)
	Orta	1 (1,4)	2 (3,0)	7 (10,4)	10 (14,9)	20 (29,9)
	Güçlü	0 (0)	3 (4,5)	2 (3,0)	3 (4,5)	8 (11,9)
	Toplamı	7 (10,4)	22 (32,8)	20 (29,9)	18 (26,9)	67 (100)

Marginal Homogeneity Test

Tablo 25. *Klebsiella*spp. Grubunda Biyofilm Üretim Derecelerinin Karşılaştırılması

ebsiella spp, n=31		Tüp Metodu				
p=0,001		Negatif	Zayıf	Orta	Güçlü	Toplamı
DKPM, N (%)	Negatif	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	Zayıf	3 (9,7)	1 (3,2)	0 (0)	0 (0)	4 (12,9)
	Orta	3 (9,7)	9 (29,0)	1 (3,2)	1 (3,2)	14 (45,2)
	Güçlü	1 (3,2)	6 (19,4)	4 (12,9)	2 (6,5)	13 (41,9)
	Toplamı	7 (22,6)	16 (51,6)	5 (16,1)	3 (9,7)	31 (100)

Marginal Homogeneity Test

4.8. Biyofilm Üretimi ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

4.8.1. Tüm hasta grubunun değerlendirilmesi

Doku kültür plak yöntemi ile biyofilm üretim sonuçları ile kolistin, meropenem ve amikasin direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 26. Tüm Hasta Grubunda Kolistin, Meropenem, Amikasin Direnci ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki

Tüm Örnekler n, (%)	Kolistin P= 1,000		Meropenem p= 1,000		Amikasin P=0,597	
N=98	S=73	R=25	S=3	R=95	S=10	R=88
Biyofilm Negatif (n=11)	8 (11)	3 (12)	0 (0)	11 (11,5)	0 (0)	11 (12,5)
Biyofilm Pozitif (n=87)	65 (89)	22 (88)	3 (100)	84 (88,5)	10 (100)	77 (87,5)

S: Duyarlı, R:Dirençli

Fisher's Exact Test

4.8.2. *Acinetobacter* spp grubunun değerlendirilmesi

Acinetobacter spp grubunda doku kültür plak metodu sonuçları ile kolistin, meropenem ve amikasin direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 27. *Acinetobacter* spp Grubunda Kolistin, Meropenem, Amikasin Direnci ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki

<i>Acinetobacter</i> spp n, (%)	Kolistin P= 0,716		Meropenem		Amikasin P=1,000	
N=67	S=51	R=16	S=0	R=67	S=2	R=65
Biyofilm Negatif (n=11)	8 (15,6)	3 (18,7)	0 (0)	11 (16,4)	0 (0)	11 (16,9)
Biyofilm Pozitif (n=87)	43 (84,4)	13 (81,3)	0 (0)	56 (83,6)	2 (100)	54 (83,1)

S: Duyarlı, R: Dirençli

Fisher's Exact Test

4.8.3. *Klebsiella* spp grubunun değerlendirilmesi

Tüm *Klebsiella* spp suşları biyofilm pozitif saptandığından antibiyotik direnci ile biyofilm üretimi arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

Tablo 28. *Klebsiella* spp Grubunun Kolistin, Meropenem, Amikasin Duyarlılığı ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki

<i>Klebsiella</i> spp	Kolistin P= 1,000		Meropenem p= 1,000		Amikasin P=0,597	
N=31	S=22	R=9	S=3	R=28	S=8	R=23
Biyofilm Negatif (n=11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Biyofilm Pozitif (n=87)	22 (100)	9 (100)	3 (100)	28 (100)	8 (100)	23 (100)

S: Duyarlı, R: Dirençli

Fisher's Exact Test

Tablo 29. *Klebsiella* spp Grubunda Seftazidim, Tigesiklin, Fosfomisin Direnci ile Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki

<i>Klebsiella</i> spp.	Seftazidim		Tigesiklin		Fosfomisin	
N=31	S=1	R=29	S=13	R=18	S=0	R=31
Biyofilm Negatif (n=11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Biyofilm Pozitif (n=87)	1 (100)	29 (100)	13 (100)	18 (100)	0 (0)	31 (100)

S: Duyarlı, R: Dirençli

Fisher's Exact Test

4.8.4. Biyofilm üretim derecesi ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin incelenmesi

Doku kültür plak yöntemi sonuçları ile kolistin duyarlılık sonuçları incelendiğinde kolistin direnci ile biyofilm üretim derecesi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Tüm biyofilm üretim derecelerinde amikasin ve meropenem direnci anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,05$).

Tablo 30. Biyofilm Üretim Derecesi ile Kolistin, Meropenem ve Amikasin Direnci Arasındaki İlişki

Tüm Örnekler n, (%) N=98	Kolistin $p=0,673^a$		Meropenem $p=0,017^*$		Amikasin $P= p=0,020^*$	
	R=25		S=3	R=95	S=10	R=88
Biyofilm negatif $OD<ODc$	8 (10,9)	3 (12)	0 (0)	11 (11,6)	0 (0)	11 (12,5)
Zayıf biyofilm $ODc<OD\leq 2ODc$	25 (34,3)	7 (28)	0 (0)	32 (33,7)	0 (0)	32 (36,3)
Orta biyofilm $2ODc<OD\leq 4ODc$	23 (31,5)	11 (44)	0 (0)	34 (35,8)	5 (50)	29 (33)
Güçlü biyofilm $4ODc < OD$	17 (23,3)	4 (16)	3 (100)	18 (18,9)	5 (50)	16 (18,2)

S: Duyarlı, R: Dirençli *Fisher Freeman Halton Exact Test

^aPearson Chi-Square Test

Tablo 31. Biyofilm Üretim Derecesi ile Seftazidim, Tigesiklin ve Fosfomisin Direnci Arasındaki İlişki

<i>Klebsiella</i> spp N=31	Seftazidim $p=0,565$		Fosfomisin		Tigesiklin $p=0,752$	
	S=1	R=29	S=0	R=31	S=13	R=18
Biyofilm negatif $OD<ODc$	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Zayıf biyofilm $ODc<OD\leq 2ODc$	0 (0)	4 (13,8)	0 (0)	4 (12,9)	1 (7,6)	3 (16,6)
Orta biyofilm $2ODc<OD\leq 4ODc$	0 (0)	14 (48,2)	0 (0)	14 (45,2)	6 (46,2)	8 (44,4)
Güçlü biyofilm $4ODc < OD$	1 (100)	11 (38)	0 (0)	13 (41,9)	6 (46,2)	7 (39)

S: Duyarlı, R: Dirençli

Fisher Freeman Halton Exact Test

4.9. Biyofilm Üretimi ile Hasta Sonlanımı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Tüm hasta grubunda biyofilm üretimi ile VİP epizodu sonlanımı ve 30 günlük hasta izlem sonlanımı açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Acinetobacter spp grubunda biyofilm üretimi ile VİP epizod sonlanımı ve 30 günlük hasta izlem sonlanımı açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Klebsiella spp grubunda tüm örnekler biyofilm üreticisi olduğundan ile VİP epizod sonlanımı ve 30 günlük hasta izlem sonlanımı açısından istatistisel olarak değerlendirilemedi.

4.10. Biyofilm üretim derecesi ile hasta sonlanımı arasındaki ilişkinin incelenmesi

Biyofilm üretim derecesi ile VİP epizodu sonlanım sonuçları karşılaştırılarak değerlendirildi. Güçlü biyofilm üretimi yapan 21 örneğin 11'i (%52,4), orta derece biyofilm üretimi yapan 34 örneğin 21'i (%61,8), zayıf biyofilm üretimi yapan 32 örneğin 17'si (%53,1), biyofilm üretimi yapmayan 11 örneğin ise 7'si (%63,6) VİP epizodu sırasında kaybedildi. VİP epizodu sonlanımı ile biyofilm üretim derecesi arasında anlamlı ilişki gözlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 32. Biyofilm Üretim Derecesi ile VİP Sonlanımı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Tüm Örnekler N=98	Mortalite N=56	İyileşme N=36	Komplikasyon N=6
Biyofilm negatif OD<ODc (n=11)	7 (12,5)	4 (11,1)	0 (0)
Zayıf biyofilm 0Dc<OD::S20Dc	17 (30,3)	12 (33,3)	3 (50)
Orta biyofilm 20Dc<OD::S40Dc	21 (37,5)	11 (30,6)	2 (33,3)
Güçlü biyofilm 40Dc <OD	11 (19,7)	9 (25)	1 (16,7)

Fisher Freeman Halton Exact Test

$p=0,963$

Biyofilm üretim derecesi ile 30 günlük hasta izlemi sonuçları karşılaştırılarak değerlendirildi. Güçlü biyofilm üretimi yapan 21 örneğin 13' ü (%61,9), orta derece biyofilm üretimi yapan 34 örneğin 24' ü (%70,6), zayıf biyofilm üretimi 32 örneğin 21' i (%65,6) ve

biyofilm üretimi yapmayan 11 örneğin ise 7'si (%63,6) 30 günlük izlem sırasında kaybedildi. Biyofilm üretim derecesi ile 30 günlük hasta izlemi sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 33. Biyofilm Üretim Derecesi ile 30 Günlük Hasta İzlenimi Sonlanımı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Tüm Örnekler	Mortalite	İyileşme/Taburcu	Servis İzleminin Devamı
N=98	65	N=28	5
Biyofilm negatif OD<ODc (n=11)	7 (10,8)	4 (14,2)	0 (0)
Zayıf biyofilm ODc<OD≤2ODc	21 (32,3)	8 (28,6)	3 (60)
Orta biyofilm 2ODc<OD≤4ODc	24 (36,9)	8 (28,6)	2 (40)
Güçlü biyofilm 4ODc <OD	13 (20)	8 (28,6)	0 (0)

Fisher Freeman Halton Exact Test

$p=0,744$

4.11. Biyofilm Üretimi ile İlişkili Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm hasta grubunda entübasyondan örnek alınana kadar geçen süre ile biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tüm hasta grubunda yoğun bakıma yatıştan örnek alınana kadar geçen süre ile biyofilm üretimi ile arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 34 . Biyofilm Üretimi ile İlişkili Verilerin Değerlendirilmesi

Değişkenler	Plaka yöntemi		p
	Biyofilm negatif, n=11	Biyofilm pozitif, n=87	
YBÜ yatıştan örnek alınana kadar geçen süre; Ort±SS (Medyan)	17,55±8,98 (15)	14,90±11,67 (13)	0,162
Entübasyondan örnek alınana kadar geçen süre; Ort±SS (Medyan)	14,91±6,12 (14)	14,52±12,98 (12)	0,277

^cMann Whitney U Test

5. TARTISMA

Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlar hasta güvenliğini olumsuz yönde en sık etkileyen komplikasyonlar olup mortalite ile morbiditenin artışına, hastanede yatış süresinin uzamasına neden olmaktadır.^{5, 6} ÇİD organizmaların ortaya çıkması, HAI sonucunda ortaya çıkan başka bir komplikasyondur.⁵ Nozokomial enfeksiyonlar invaziv ekipman kullanımının ve girişimsel işlemlerin daha sık uygulanması nedeniyle en sık yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir.^{5, 1, 23} *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* sıklıkla yoğun bakımlarda nozokomial enfeksiyonların önemli kısmından (VIP, İYE vb.) sorumlu olup mortalite ve morbidite oranlarının artışı, hastanede yatış süresinde uzama ve sağlık bakım maliyetinde artış ile ilişkilidir.^{5, 7, 8}

VİP sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlar arasında sık görülmesi ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle önemlidir.^{2, 1, 31} Son yıllarda yapılan araştırmalar sayesinde endotrakeal tüp yüzeyinde biyofilm varlığının VİP gelişimine zemin hazırladığı gösterilmiştir.¹⁷ Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların antimikrobiyallerden ve konak immun sisteminden korunmasına neden olarak yetersiz tedavi nedeniyle enfeksiyon persistansına ve nüksüne yol açmaktadır.^{14, 1, 5} Antibiyotik tedavisine başlangıç yanıtı alınmakla birlikte sıklıkla biyofilm yapısının korunaklı yapısı içerisinde antibiyoterapiden korunan mikroorganizmalar nedeniyle relapslar görülmektedir.⁴⁸

Çalışmamızda VİP gelişimine sebep olan *Klebsiella* spp ve *Acinetobacter* spp suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve biyofilm yapabilme kapasiteleri farklı yöntemlerle test edilerek; biyofilm analiz yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları, biyofilm yapımı ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki, biyofilm oluşumunun hasta sonlanımına etkisi incelendi. Çalışmaya dahil edilen hastaların %62'si erkekti ve yaş ortalaması 67,5 (min:18, max:98). Wang⁷¹ ve arkadaşlarının Çin'de üçüncü basamak sağlık kuruluşunda HAI etkenlerini incelediği çalışmada çalışmamıza benzer şekilde çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet dağılımı (%64,4 erkek) ve yaş ortalaması (>60) çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler e-test yöntemi ile seftazidim, amikasin ve meropenem duyarlılıkları açısından test edildi. Örneklerin %85,7'sinde amikasine, %93,6'sında meropeneme %96,9'unda ise seftazidime e-test yöntemiyle direnç saptandı. Meropenem, amikasin ve seftazidime direnç oranı *Acinetobacter* spp grubunda *Klebsiella* spp grubundan daha yüksek bulundu. Tüm örnekler mikrodilüsyon yöntemiyle meropenem, amikasin ve

kolistin duyarlılığı açısından test edildi. *Klebsiella* spp grubunda ek olarak fosfomisin, seftazidim ve tigesiklin duyarlılığı test edildi. Tüm örneklerin %89,8'i %96,9'unda meropenem ve %25,5'inde kolistine direnç saptandı. Amikasin ve meropenem direnç oranı *Acinetobacter* spp grubunda *Klebsiella* spp grubundan daha yüksek bulundu.

E-test yöntemi ve mikrodilüsyon testi sonuçları karşılaştırıldığında *Klebsiella* spp grubunda seftazidim, meropenem ve amikasin duyarlılıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=1,000$, $p=1,000$, $p=0,508$; $p>0,005$). *Acinetobacter* spp mikrodilüsyon yöntemi ile tüm suşlar meropenem dirençli bulunduğundan e-test yöntemi ile mikrodilüsyon testi arasında meropenem duyarlılığı açısından istatistiksel ilişki değerlendirilemedi. *Acinetobacter* spp grubunda E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri arasında amikasin duyarlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p=1,000$, $p>0,005$). Tüm örneklerin meropenem ve amikasin duyarlılıkları açısından e-test ve mikrodilüsyon yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,500$, $p=0,344$; $p>0,005$). E test yönteminin duyarlılık, özgüllük, negatif ve pozitif prediktif değer ve doğruluk değerleri *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp ve tüm hasta grubunda değişkenlik göstermektedir. E-test yönteminin pahalı olması ve test sonuçlarının gruplar arasında değişkenlik göstermesi nedeniyle genetik direnç çalışmalarının yapılamadığı durumlarda mikrodilüsyon testinin kullanımının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda hem e-test yöntemiyle hem de mikrodilüsyon yöntemiyle amikasin ve meropenem direncinin *Acinetobacter* spp grubunda *Klebsiella* spp grubundan dahayüksek saptanmıştır. Wang⁷¹ ve arkadaşlarının çalışmasında çalışmamızla benzer şekilde *A.baumanii* suşlarında karbapenem ve amikasin direnci *K.pneumoniae* suşlarına kıyasla daha yüksek saptanmıştır. Moolchandani⁷² ve arkadaşlarının Hindistan'da yoğun bakımda yatan hastalardan izole edilen örnekleri değerlendirdiği çalışmada çalışmamıza benzer şekilde izole edilen *A.baumanii* suşlarında karbapenem ve amikasin direnci *K.pneumoniae* suşlarından daha sık saptanmıştır.

Çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemiyle test edilen örneklerin %97,6'sı çok ilaca dirençli mikroorganizma tanımına uymakta olup 22 örnek (%22,4) test edilen üç antibiyotiğe de dirençliydi. Wang⁷¹ ve arkadaşlarının çalışmasında HAI etkeni olan 7579 izolatın 3223'ünde (%42.5) çok ilaca direnç mevcuttu. Mevcut çalışma üçüncü basamak hastanede yapılmış olmakla birlikte hastanenin tüm bölümlerinden alınan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir.

Bizim çalışmamızda sadece yoğun bakımda yatan hastalar çalışmaya dahil edildiğinden ÇİD oranının bizim çalışmamızda daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Moolchandani⁷² ve arkadaşlarının Hindistan'da yoğun bakımda yatan hastalardan izole edilen örnekleri değerlendirdiği çalışmada çalışmaya dahil edilen örneklerin %55,7'sinde ÇİD saptanmıştır.

Çalışmamızda antibiyotik direnç oranının yüksek olmasının hastaların son 90 gün içerisinde antibiyotik kullanım öyküsü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Raman⁷³ ve arkadaşlarının yaptığı meta analizde hastaların geçmiş antibiyotik kullanım öyküsünün antibiyotik direnç gelişiminde en belirgin risk faktörü olduğu bulunmuştur. Liu⁷⁴ ve arkadaşlarının çok ilaca direnç gelişimine etki eden risk faktörlerini değerlendirdiği meta analizde antibiyotik kullanım öyküsünün de dahil olduğu 16 risk faktörü tanımlanmıştır.⁷⁴

Doku kültür plak metodunda 87 izolat pozitif saptanırken string testinde bu olguların yalnız 5' i pozitif saptanmıştır. String testinin duyarlılığı %5,75, özgüllüğü %90,91 olarak hesaplandı. Vuotto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada biyofilm üreticisi olduğu bilinen suşlarda string yöntemi ile pozitif sonuç saptanmaması çalışmamız sonuçlarıyla uyumludur.⁴²

Doku kültür plak metoduyla negatif sonuçlanan 11 izolatın 10'u kongo kırmızısı agar yönteminde yine negatif saptanmış ve 1 örnek ise pozitif sonuçlanmıştır. Kongo kırmızısı agar metodunun duyarlılığı %22,99, özgüllüğü ise %90,91 hesaplandı. Hassan⁷⁵ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çalışmamızla benzer şekilde Kongo kırmızısı agar metodunun duyarlılığı düşük (%11), özgüllüğü ise %92 bulunmuştur.⁷⁵ Mishra⁷⁶ ve arkadaşlarının çalışmasında ise çalışmamızdan farklı olarak testin duyarlılığı %44,8, özgüllüğü ise %52,6 bulunmuştur.⁷⁶

Tüp metodunda ise doku kültür plak metoduyla negatif sonuçlanan 11 izolatın tamamı tüp metodunda pozitif saptanmıştır. Tüp metodunun duyarlılığı %83,91, özgüllüğü ise %0 hesaplandı. Hassan⁷⁵ ve arkadaşlarının biyofilm analiz testlerini değerlendirdiği çalışmasında tüp metodunun duyarlılığı çalışmamıza benzer şekilde yüksek (%73), özgüllüğü ise çalışmamıza kıyasla daha yüksek (%92,5) bulunmuştur.⁷⁵ Mishra⁷⁶ ve arkadaşlarının çalışmasında ise tüp metodunun duyarlılığı çalışmamıza benzer şekilde yüksek %80,7, özgüllüğü ise çalışmamıza kıyasla daha yüksek (%66,7) bulunmuştur.⁷⁶

String testi pratik, hızlı ve ucuz olmakla birlikte testin biyofilm üretimini saptama oranı düşüktür. Yanlış negatif sonuç oranının yüksek olması nedeniyle biyofilm ilişkili araştırmalarda kullanımı kısıtlıdır. Kongo kırmızısı agar metodu pratik, hızlı ve ucuz bir yöntem olmasına rağmen koloni morfolojisinin değerlendirilmesi ile sonuçlandığından negatif sonuç biyofilm

üretimini dışlamamaktadır. Canı tüp yüzeyindeki biyofilm yapısının çıplak gözle değerlendirilmesi esasına dayanan tüp metodunda tüp yüzeyindeki rezidü boya kalıntıları okuyucu tarafından biyofilm lehine yanlış yorumlanabilmektedir.^{42, 67} Tüp metodunun duyarlılığı Kongo kırmızısı agar metodu ve string testine kıyasla daha yüksek olmasına rağmen test sonuçlarının okuyucunun klinik deneyimine ve test koşullarına göre değişkenlik göstermesi nedeniyle biyofilm araştırmalarında kullanımının uygun olmadığını düşündürmektedir. Doku kültür plak metodu test basamaklarının karmaşık olmasına rağmen biyofilm oluşumunu niceliksel olarak ölçebilmesi ve objektif sonuç vermesi nedeniyle invitro biyofilm araştırmalarında altın standart test olarak kullanılmaya devam etmektedir. Test sonucunda elde edilen biyofilm derecelerinin medikal ekipman yüzeyindeki biyofilm derecesi ile korelasyonunu inceleyen daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar antibiyoterapiye direnç gelişiminde önemli bir mekanizmadır.^{12,14,44} Çalışmamızda suşların %88,8'inde biyofilm pozitif olup kolistin, meropenem ve amikasin direnci ile biyofilm üretimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). Cepas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada biyofilm yapısı ile herhangi bir antimikrobiyal grubuna direnç arasında ilişki saptanmaması çalışmamızdaki bulguları desteklemektedir.⁷⁷ Çalışmamızda biyofilm üretim derecesi ile kolistin direnci arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Tüm biyofilm üretim derecelerinde amikasin ve meropenem direnci daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Vuoto⁴² ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çalışmamızla benzer şekilde biyofilm üretim derecesi ile karbapenem direnci arasında anlamlı ilişki gözlenmedi. Aynı çalışmada XDR ve MDR suşlarda biyofilm üretimi anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Çalışmamızda duyarlı suşların ve biyofilm üretimi saptanmayan suşların yeterli sayıda olmaması nedeniyle bu ilişkinin gözlenememiş olduğu düşünülmektedir.

Subinhibitör konsantrasyonda antibiyoterapi öyküsünün biyofilm oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir.⁷⁸ Kaplan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ⁷⁹ pek çok antimikrobiyalın çeşitli mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunu indüklediği gösterilmiş olup çalışmamızda hastaların tamamında VIP epizodu öncesi antibiyoterapi kullanım öyküsünün olması ile biyofilm oranının yüksek saptanmasının ilişkili olduğu düşünüldü. Uygunsuz antibiyoterapi nedeniyle gelişen antibiyotik direncinin ve biyofilm oluşumunun önlenmesi amacıyla bölgesel ve kurumsal direnç verilerinin göz önünde bulundurularak uygun antibiyoterapi politikalarının oluşturulması gerektiği düşünülmüştür.

Çalışmamızda olguların yoğun bakıma yatışından ve entübasyondan örnek alınana kadar geçen süreler ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Wilson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada biyofilm oluşumu ile VİP gelişimi arasında ilişki saptanmış olmasına rağmen çalışmamızla benzer şekilde entübasyon süresi ile biyofilm oluşumu arasında ilişki saptanmamıştır.⁸⁰ Danin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada entübasyondan kısa süre sonra biyofilm oluşumunun başladığı gösterilmiş olmakla birlikte entübasyon süresi ile biyofilm dercesi/kalınlığı arasında ilişki gösterilememiştir.⁹ Entübasyon süresi ile biyofilm derecesi arasında anlamlı ilişki net olarak gösterilememiş olmakla birlikte biyofilm oluşumu entübasyonun hemen ardından başlamakla birlikte endotrakeal tüp mevcut olduğu sürece biyofilm maturasyonu devam etmektedir.¹⁷ Endotrakeal tüp varlığının biyofilm oluşumunu kolaylaştırması ve VİP gelişimini kolaylaştırıcı faktör olması nedeniyle hastaların belirli aralıklarla ekstübasyon açısından değerlendirilmesinin VİP riskini azaltacağı düşünülmüştür.

Çalışmamızda VİP atağının ve 30 günlük hasta izleminin sonlanımı açısından *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Biyofilm üretimi saptanan ve saptanmayan suşlar arasında VİP atağının ve 30 günlük hasta izleminin sonlanımı açısından ilişki saptanmadı. Çalışmamızda biyofilm üretimi saptanmayan örnek sayısının yeterli olmaması nedeniyle biyofilm üretimi ile hasta sonlanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilememiştir. Biyofilm yapısının sıklıkla antibiyotik direnci olan suşlar tarafından oluşturulması ve biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmaların konak immun yanıtından ve antibiyoterapiden korunması tedavi başarısızlığına neden olmak tadır.^{15 17} Biyofilm oluşumu antibiyotik direncine, nükslere ve metastatik enfeksiyonlara sebep olduğu bilindiğinden biyofilm ilişkili mortalitenin ve komplikasyonların önlenmesi amacıyla girişimsel işlemlerin uygun steril teknikle uygulanması, antibiofilm materyal tercih edilmesi önerilmektedir.^{15 17 43}

Türkiye' de VİP gelişimine sebep olan mikroorganizmaların biyofilm üretim kapasitesinin antibiyotik duyarlılığı ve hasta sonlanımı ile ilişkisinin incelendiği çalışma sayısı yeterli değildir. Çalışmamızda yoğun bakım ünitesinde tedavi gören hastaların VİP epizodu sırasında trakeal sekresyon örneklerinden izole edilen *Acinetobacter* spp ve *Klebsiella* spp suşlarının e-test ve mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları, string testi, Kongo kırmızısı agar metodu, tüp metodu ve doku kültür plak metodu ile biyofilm üretim kapasiteleri

belirlenmiştir. Elde edilen verilerin hasta sonlanımı ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastaların VIP tanısı almış olması, biyofilm üretimi yapmayan suş oranının yeterli olmaması, antibiyotik direncinin yüksek olması çalışmanın kısıtlılıkları olarak değerlendirilmiştir. Hasta ve örnek sayısının artırılarak ileri çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.



6. SONUC VE ÖNERİLER

Çalışmamızda hem e-test yöntemiyle hem de mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal direnci yüksek saptanmıştır. Her iki test arasında anlamlı istatistiksel ilişki gösterilememiş olmakla birlikte, e-test yönteminin duyarlılık, özgüllük, negatif ve pozitif prediktif değer ve doğruluk değerleri *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp ve tüm hasta grubunda değişkenlik göstermektedir. E-test yönteminin pahalı olması ve test sonuçlarının gruplar arasında değişkenlik göstermesi nedeniyle genetik direnç çalışmalarının yapılamadığı durumlarda mikrodilüsyon testinin kullanımının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda hem antibiyotik direnç oranlarının hem de biyofilm üretim oranlarının yüksek saptanması biyofilm yapısı ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkiyi doğrulamaktadır. Subinhibitör konsantrasyonda ve uygunsuz antibiyotik kullanımının biyofilm oluşumunu ve antibiyotik direncini indüklediği bilinmektedir. Çalışmaya alınan hastaların tümünde örnek alımından önce antibiyotik kullanım öyküsünün mevcut olması antibiyotik direnç oranının ve biyofilm üretim oranının yüksek olmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Bölgesel ve kurumsal antibiyotik duyarlılık sonuçları göz önünde bulundurularak uygun antibiyotik kullanım politikalarının oluşturulması ve hasta izleminde uygulanması biyofilm ilişkili, tedavisi güç enfeksiyonların engellenmesi açısından önem taşımaktadır.

Biyofilm üretiminin araştırıldığı testler arasında en yüksek duyarlılık tüp metodunda ardından sırasıyla kongo agar metodu ve en düşük string testinde saptandı. Tüp metodunda test duyarlılığının yüksek olmasına rağmen yanlış pozitiflik oranı oldukça yüksek olduğundan biyofilm araştırmalarında kullanımı kısıtlıdır. Doku kültür plak metodu test basamaklarının karmaşık olmasına rağmen biyofilm oluşumunu niceliksel olarak ölçebilmesi ve objektif sonuç vermesi nedeniyle invitro biyofilm araştırmalarında altın standart test olarak kullanılmaya devam etmektedir. Test sonucunda elde edilen biyofilm derecelerinin medikal ekipman yüzeyindeki biyofilm derecesi ile korelasyonunu inceleyen daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Hasta Sonlanımları ile yüksek direnç oranı ve yüksek biyofilm üretimi ile ilişkisi incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamadı. Çalışmanın örnek sayısının duyarlı suşları ve biyofilm üretimi yapmayan örnekleri kapsayacak şekilde arttırılarak tekrarlanması uygun olacaktır.

7. **KAYNAKLAR**

1. Healthcare-associated infections | HAI | CDC. Accessed April 25, 2021. <https://www.cdc.gov/hai/>
2. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63(5):e61-e111. doi:10.1093/cid/ciw353
3. Metersky ML, Kalil AC. New guidelines for nosocomial pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*. 2017;23(3):211-217. doi:10.1097/MCP.0000000000000367
4. Al-Tawfiq JA, Tambyah PA. Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *J Infect Public Health*. 2014;7(4):339-344. doi:10.1016/j.jiph.2014.04.003
5. Sikora A, Zahra F. Nosocomial Infections. StatPearls. Published February 10, 2021. Accessed May 1, 2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32644738>
6. Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet*. 2003;361(9374):2068-2077. doi:10.1016/S0140-6736(03)13644-6
7. Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA - JAm Med Assoc*. 2009;302(21):2323-2329. doi:10.1001/jama.2009.1754
8. Ibrahim EH, Tracy L, Hill C, Fraser VJ, Kollef MH. The occurrence of ventilator-associated pneumonia in a community hospital: Risk factors and clinical outcomes. *Chest*. 2001;120(2):555-561. doi:10.1378/chest.120.2.555
9. Danin PE, Girou E, Legrand P, et al. Description and microbiology of endotracheal tube biofilm in mechanically ventilated subjects. *Respir Care*. 2015;60(1):21-29. doi:10.4187/respcare.02722
10. Inglis TJJ, Millar MR, Jones JG, Robinson DA. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol*. 1989;27(9):2014-2018. doi:10.1128/jcm.27.9.2014-2018.1989
11. Vandecandelaere I, Coenye T. Microbial composition and antibiotic resistance of

- biofilms recovered from endotracheal tubes of mechanically ventilated patients. *Adv Exp Med Biol*. 2015;830:137-155. doi:10.1007/978-3-319-11038-7_9
12. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
 13. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*. 2006;64(4):313-325. doi:10.1016/j.jhin.2006.06.028
 14. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* (80-). 1999;284(5418):1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
 15. Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E. Antibiotic resistance: A “dark side” of biofilm-associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn* 2013;123(6):309-313. doi:10.20452/pamw.1780
 16. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011;3(2):55-65. doi:10.4248/IJOS11026
 17. Diaconu O, Siriopol I, Poloşanu LI, Grigoraş I. Endotracheal Tube Biofilm and its Impact on the Pathogenesis of Ventilator-Associated Pneumonia. *J Crit Care Med*. 2018;4(2):50-55. doi:10.2478/jccm-2018-0011
 18. Hochman S, Phillips M. *Acinetobacter Species* Ninth Edit. Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/B978-0-323-48255-4.00222-8
 19. Nelson GE, Greene MH. Enterobacteriaceae. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. ; 2020:2669-2685. doi:10.1016/B978-0-323-48255-4.00218-6
 20. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: Use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis* 2008;46(7):1069-1077. doi:10.1086/527442
 21. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-

- associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36(5):309-332. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.002
22. Monegro AF MVRH. Hospital Acquired Infections - StatPearls - NCBI Bookshelf. StatPearls . Published 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441857/>
 23. Chen Y-Y, Chou Y-C, Chou P. Impact of Nosocomial Infection on Cost of Illness and Length of Stay in Intensive Care Units. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005;26(3):281-287. doi:10.1086/502540
 24. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N Engl J Med* 2014;370(13):1198-1208. doi:10.1056/nejmoa1306801
 25. Magill SS, O’Leary E, Janelle SJ, et al. Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. *N Engl J Med* 2018;379(18):1732-1744. doi:10.1056/nejmoa1801550
 26. Suetens C, Latour K, Kärki T, et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: Results from two european point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* 2018;23(46). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516
 27. Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: Systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;377(9761):228-241. doi:10.1016/S0140-6736(10)61458-4
 28. Stiller A, Schröder C, Gropmann A, et al. ICU ward design and nosocomial infection rates: a cross-sectional study in Germany. *J Hosp Infect*. 2017;95(1):71-75. doi:10.1016/j.jhin.2016.10.011
 29. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The Prevalence of Nosocomial Infection in Intensive Care Units in Europe: Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. *JAMA J Am Med Assoc* 1995;274(8):639-644. doi:10.1001/jama.1995.03530080055041
 30. Allegranzi B. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection

- Worldwide Clean Care is Safer Care. *World Heal Organ*. Published online 2011:34. Accessed September 30, 2021. www.who.int
31. Cillóniz C, Dominedò C, Torres A. An overview of guidelines for the management of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(6):656-662. doi:10.1097/QCO.0000000000000596
 32. Perl TM, and Infection Control in Acute Care Settings. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):141-173. doi:10.1128/CMR.00027-10
 33. Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2010, device-associated module. *Am J Infect Control*. 2011;39(10):798-816. doi:10.1016/j.ajic.2011.10.001
 34. Fàbregas N, Ewig S, Torres A, et al. Clinical diagnosis of ventilator associated pneumonia revisited: Comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies. *Thorax*. 1999;54(10):867-873. doi:10.1136/thx.54.10.867
 35. Haliloglu M, Bilgili B, Bilginer H, et al. A new scoring system for early diagnosis of ventilator-associated pneumonia: LUPPIS. *Arch Med Sci*. 2020;16(5):1040-1048. doi:10.5114/AOMS.2020.97965
 36. Zhou XY, Ben SQ, Chen HL, Ni SS. A comparison of APACHE II and CPIS scores for the prediction of 30-day mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. *Int J Infect Dis*. 2015;30:e144-e147. doi:10.1016/j.ijid.2014.11.005
 37. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 2015;64(4):323-334. doi:10.1099/jmm.0.000032
 38. Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RHH, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: A meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(8):665-671. doi:10.1016/S1473-3099(13)70081-1
 39. Serra-Burriel M, Keys M, Campillo-Artero C, et al. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults:

- Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15(1):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0227139
40. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004;32(8):470-485. doi:10.1016/j.ajic.2004.10.001
 41. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005;41(6):848-854. doi:10.1086/432803
 42. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol*. 2017;123(4):1003-1018. doi:10.1111/jam.13533
 43. Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, et al. Relationship between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist*. 2019;25(1):72-79. doi:10.1089/mdr.2018.0027
 44. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*. 1978;238(1):86-95. doi:10.1038/scientificamerican0178-86
 45. Falagas ME, Kopterides P, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients [6]. *Clin Infect Dis*. 2006;43(3):389. doi:10.1086/505599
 46. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD. Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med*. 1972;77(5):701-706. doi:10.7326/0003-4819-77-5-701
 47. Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Front Microbiol*. 2021;12(May):1-19. doi:10.3389/fmicb.2021.676458
 48. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(1):51-65. doi:10.1080/14787210.2018.1417036
 49. Cook LCC, Dunne GM. The Influence of Biofilms in the Biology of Plasmids. *Microbiol*

Spectr. 2014;2(5):0012. doi:10.1128/microbiolspec.plas-0012-2013

50. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* (80-). 1998;280(5361):295-298. doi:10.1126/science.280.5361.295
51. Vincent FC, Tibi AR, Darbord JC. A bacterial biofilm in a hemodialysis system. Assessment of disinfection and crossing of endotoxin. *ASAIO Trans.* 1989;35(3):310-313. doi:10.1097/00002216-198907000-00043
52. Pier GB, Saunders JM, Ames P, et al. Opsonophagocytic Killing Antibody to *Pseudomonas aeruginosa* Mucoid Exopolysaccharide in Older Noncolonized Patients with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med.* 1987;317(13):793-798. doi:10.1056/nejm198709243171303
53. Shiau AL, Wu CL. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol.* 1998;42(1):33-40. doi:10.1111/j.1348-0421.1998.tb01966.x
54. Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J Med Microbiol.* 1992;36(6):406-413. doi:10.1099/00222615-36-6-406
55. Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of a conjugative transposon, Tn 5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;177(1):63-66. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13714.x
56. Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3710-3713. doi:10.1128/aem.65.8.3710-3713.1999
57. Hatch RA, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(4):974-977. doi:10.1128/aac.42.4.974
58. Gordon CA, Hodges NA, Marriott C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1988;22(5):667-674. doi:10.1093/jac/22.5.667

59. Evans DJ, Allison DG, Brown MRW, Gilbert P. Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to ceftrimide. *J Antimicrob Chemother.* 1990;26(4):473-478. doi:10.1093/jac/26.4.473
60. Duguid IG, Evans E, Brown MRW, Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived staphylococcus epidermidis evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother.* 1992;30(6):791-802. doi:10.1093/jac/30.6.791
61. Dagostino L, Goodman AE, Marshall KC. Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling* 1991;4(1-3):113-119. doi:10.1080/08927019109378201
62. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Available at: <http://www.eucast.org>. Published online 2021.
63. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
64. Kumabe A, Kenzaka T. String test of hypervirulent Klebsiella pneumonia. *QJM.* 2014;107(12):1053. doi:10.1093/qjmed/hcu124
65. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42(8):872-874. doi:10.1136/jcp.42.8.872
66. Harika K, Shenoy V, Narasimhaswamy N, Chawla K. Detection of biofilm production and its impact on antibiotic resistance profile of bacterial isolates from chronic wound infections. *J Glob Infect Dis* . 2020;12(3):129-134. doi:10.4103/jgid.jgid_15019
67. Alamri AM, Alsultan AA, Ansari MA, Alnimr AM. Biofilm formation in clonally unrelated multidrug resistant acinetobacter baumannii isolates. *Pathogens* . 2020;9(8):14. doi:10.3390/pathogens9080630
68. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* . 1985;22(6):996-1006.

doi:10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985

69. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891-899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
70. de Campos PA, Royer S, da Fonseca Batistão DW, et al. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. *Curr Microbiol*. 2016;72(5):617-627. doi:10.1007/s00284-016-0996-x
71. Wang M, Wei H, Zhao Y, et al. Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. *Bosn J Basic Med Sci*. 2019;19(1):86-93. doi:10.17305/BJBMS.2018.3826
72. Moolchandani K, Sastry AS, Deepashree R, Sistla S, Harish BN, Mandal J. Antimicrobial resistance surveillance among intensive care units of a tertiary care hospital in South India. *J Clin Diagnostic Res*. 2017;11(2):DC01-DC07. doi:10.7860/JCDR/2017/23717.9247
73. Raman G, Avendano EE, Chan J, Merchant S, Puzniak L. Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: A systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7(1):1-14. doi:10.1186/s13756-018-0370-9
74. Liu P, Li X, Luo M, et al. Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Meta-Analysis. *Microb Drug Resist*. 2018;24(2):190-198. doi:10.1089/mdr.2017.0061
75. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian J Infect Dis*. 2011;15(4):305-311. doi:10.1016/s1413-8670(11)70197-0
76. Sharma M, Sapkota J, Jha B, Mishra B, Bhatt CP. Biofilm formation and extended - spectrum beta-lactamase producer among *acinetobacter* species isolated in a tertiary care hospital: A descriptive cross-sectional study. *J Nepal Med Assoc*. 2019;57(220):432-436.

doi:10.31729/jnma.4726

77. Cepas V, L6pez Y, Mufioz E, et al. Relationship between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist.* 2019;25(1):72-79. doi:10.1089/mdr.2018.0027
78. Ranieri MR, Whitchurch CB, Burrows LL. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45:164-169. doi:10.1016/j.mib.2018.07.006
79. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs.* 2011;34(9):737-751. doi:10.5301/ijao.5000027
80. Wilson A, Gray D, Karakiozis J, Thomas J. Advanced endotracheal tube biofilm stage, not duration of intubation, is related to pneumonia. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72(4):916-923. doi:10.1097/TA.Ob013e3182493a10

8. EKLER

EK-1 Klinik Pulmoner Enfeksiyon Skoru (KPES)

Değişkenler	0 Puan	1 Puan	2 Puan
Vücut Sıcaklığı	36.5- 38.4	38.5- 38.9	2: 39 Ya Da < 36.5
Beyaz Küre Sayısı	4000-11.000	<4000 ya da > 11.000	
Trakeal Sekresyon	Trakeal sekresyonda artış yok	Sekresyon artışı var ama pürülan değil	Belirgin pürülan sekresyon
Oksijenizasyon PaO2 /FiO2	240 Ya Da ARDS		<240 ve ARDS Değil
Akciğer Görüntüleme	İnfiltrasyon yok	Diffüz ya da yamalı infiltrasyon	Lokelize infiltrasyon
Kültür	Üreme yok veya nonpatojen üreme	Patojen üreme	
		Gram boyalı preperatta uyumlu boyanma +1 puan	

EK -2 HAI, VİP ve ÇİD Mikroorganizma ile Enfeksiyon Gelişimine Etki Eden Risk Faktörleri

HAI Gelişimine Etki Eden Risk Faktörleri

- İnvaziv ekipman kullanımı
- İmmüsupresyon
- Ventilasyon süresi (beş gün ve daha uzun)
- ÇİD organizma ile kolonizasyon
- İleri yaş (65 yaş ve üzeri)
- Hastanede kalış süresi (beş gün ve daha uzun)
- Yoğun bakım yatış süresi (beş gün ve daha uzun)
- Altta yatan komorbiditeler
- Cerrahi girişim varlığı
- Bakım evinde kalma

VİP Gelişimine Etki Eden Risk Faktörleri

- İleri yaş (65 yaş ve üzeri)
- ÇİD organizma ile kolonizasyon
- Beş gün ve daha uzun hastanede kalış süresi

Veya

- 30 gün içerisinde 2 gün veya daha uzun hastane yatışı
- Aspirasyon
- Ventilasyon süresi (beş gün ve daha uzun)
- Reentübasyon
- Sedasyon, supin pozisyonu, enteral beslenme,

ÇİD Mikroorganizma ile Enfeksiyon Gelişimine Etki Eden Risk Faktörleri

- Son 90 gün içinde antibiyotik kullanımı
- VİP kliniği sırasında ARDS varlığı
- VİP kliniği sırasında septik şok varlığı
- VİP kliniği öncesi 5 gün veya daha fazla hastanede yatış öyküsü
- Akut böbrek yetmezliği nedeniyle renal replasman ihtiyacı